### ⑩日本国特許庁(JP)

10 特許出願公表

## ⑫公表特許公報(A)

 $\Psi 5 - 504889$ 

個公表 平成5年(1993)7月29日

@Int. Cl. 5

鑑別記号

庁内整理番号

8931-4B

審查請求有 予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

ZNA

8114-4B

(全 60 頁)

図発明の名称

165及び235 r R N A遺伝子間のスペーサー領域から誘導される非ウイルス微生物検出

C 12 N 15/00

用ハイブリダイゼーションプローブ

到特 願 平3-508127

●②出 順 平3(1991)4月18日

❷翻訳文提出日 平4(1992)10月19日

A \*

**包国際公開番号 WO91/16454 砂国際公開日 平3(1991)10月31日** 

優先権主張 図1990年 4月18日 図 所特許機構(EP) 1990401054.3

ロツサウ,リユデイ 120発明者

ベルギー国、ベーー2070・エケレン、ウイルへフーベストラート・

エヌ・ベー・イノヘネテイク 切出願人

ス・エス・アー

ペルギー国、ペーー9710・ヘント、ポツクス・4、インドウストリ

ーパルク・ズベイナールデ・7

190代 理 人

弁理士 川口 義雄 外3名

動指定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域

特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, LU(広域特許), N

L(広域特許),SE(広域特許),US

最終頁に続く

#### 請求の範囲

1. 非ウイルス生物、特に収核生物、より特定的には緩鬱 の r R N A 遺伝子間のスペーサー戦域の少なくとも約15 ヌクレオチド、好ましくは約15ヌクレオチドースペーサ 一個域のほぼ最大数のヌクレオチド、より折ましくは約1 5~約100ヌクレオチドから構成されるプローブ。

2. 検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定 的には細胞に固有であるように重択されたFRNA遺伝子 扇のスペーサー機能、特に16SrRNA遺伝子及び23 SrRNA遺伝子間のスペーサー価値の配列にハイブリダ イズするために十分钼精的なオリゴヌクレオチドを構築す る段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーショ ンアッセイ用プローブであって、rRNA遺伝子間のスペ ーサー領域の前記配列が、

- \* 目的生物のrRNA遺伝子面のスペーサー信域のタク レオチド配列を、最近胸間のTRNA遺伝子間のスペーサ 一貫域のヌクレオチド配列と比較し、

最近限権のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間の スペーサー賞城との間に少なくとも1つのミスマッチを有 する目的生物のェRNA遺伝子面のスペーサー層域の少な くとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15~ほぼ最大 数のヌクレオチド、より好ましくは約15~約100ヌク レオチドの配列を選択することにより、又は

- ◆ 短載スペーサー領域を得るように、目的生物の r R N A遺伝子間のスペーサー根域からtRNA遺伝子及び場合 によりシグナル配列を欠失させ、

+少なくとも約15ヌクレオチド、好ましくは的15~ス ベーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましく は約15~約100gクレオチドから無慮され目つ目的生 物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリ ダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行線 既により決定することにより、

選択されることを特徴とする請求項1に記載のプローブ。 3. - 核酸グループ:

グループNG11:

CEATGOSTOS TRATTOTACT TOGO

NCII

GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

NG I 1 1 C

GCEAAGUAGA AUAACGACGC AUCG CCAUGEORCE BRADRERACH RCCC

NCILICA NCIIR

グループNGI2:

<b>73</b>	表	Ŧ	5.	-50	48	89	(2)

		74 94 1 0 00 24	, uo ( — )
TTCGTTTACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC	NG 12	TGCGTTCGAT ATTGCTATCT ACTGTGCA	NH14
CTTTCCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA EGAA	NG121C	TECHCACTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NKI4IC
CUBUCCUUAC UDAGBCAACG GGUAGGUAAA CGAA	NG121CR	UGCACAGUAG AWAGCAAWAU CGAACGCA	NH I 4 I CR
UUGGUUDACC DACCCGUUGA COAAGDAAGC AAAC	NGIZR	BECCARCOVA VARCANCA VCACACV	NHI4R
グループMMI1:		グループNM15:	
GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG	NH 1	TTTTGTTCTTGGTCAAGTCTGACGTCGCCCTGAATGGATI	CTETTCCATT
CAGGGGGACG TCACACTIGA CC	MM111C		N # 1 5
CAGGECGACG UCACACUUGA CC	MMITICA	ANTGGAACAGAATCCATTCAGGGCGACGTCACACTTGACC	AAGAACAAAA
CCUCAAGUGU GACGUCGCCC UC	MMIIR		NHISIC
グループ NH12:		AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGAC	AAGAACAAAA
CTTCTTCGTC AACTGTCACC IC	N H I 2		NNISICR
GACGTCACAC TTGACCAAGA AC	MHIZIC	DUUUGUUCUUGGUCAAGUGUGACGUCGCCCUGAAUGGAUU	CUGUUCCAUU
GACGUCACAC BUGACEAAGA AC	NH 121 CR		NHISR
CONCRACENC VVENCACE NC	NM I 2 R	グルーアNHI8:	
グループNH13:		TITGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC	N N 1 6
GCGTTCGTTA TAGCTATCTA CTGTGC	NHI3	CTCTGATGTT CTAGTCAACG CAATGTTAGG CAAA	NN 16 [C
CCACACTAGA TAGCTATAAC GAACCC	NHISIC	COCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUCUUAGG CAAA	NH161CR
GCACAGUACA UAGCUABAAC GAACGC	NNIBICR	BUUGCCUAAC ABUCCGUUGA CUAGAACADC AGAC	HHIGR
GCGUUCGUUA WAGCUAUCUA CUGUGC	WM J 3 R	ブループ HD[1:	
グループNH14:		TTATTATGCG CGAGGCATAT TG	H D [ 1
CANTATECET CECECATANT AN	MDITEC	AACTECCETC AATTTGATGC GT	HIIIIC
CAAUAUGCCU CGCGCAUAAU AA	HDILICR	ANGUGEGUE ANUUUGAUGE GU	BILLICR
NUAUUAUGCG CGAGGCAUAU UC	#DI1R	ACGCAUCAAA UUGACCGCAC UV	8111R
グルーアBCI1:		グループRII2:	
TTAAACATCT TACCAAAC	BCII	ACTITURACT GARACTIAN AG	H112
CTTTGGTAAG ATGTTTAA	BCI11C	CTITANGTTT TCACTTCAAA GT	##121C
CODUCCUAAC AUCUUUAA	BCIlicr	CHRRVEARR RCURCUVV CD	BIIZICR
UDAAACAUCU UACCAAAG	BCIIR	ACDUUGAAGU GAAAACUUAA AG	E112R
グループBC12:		グループSAI1:	
TIGATETITA AACTIGCTIG GIGGA	BCI2	AATCGARAGG TTCAAATTGT T	SAII
TECACCAAGE AAGTTTAAAC ATCAA	BC121C	AACAATTIGA ACCITTCGAT T	SAILIC
UCCACCANGC ANGUBUNANC AUCAN	BCIZICR	AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U	SALLICR
UUGAUGBUUA AACUUGCODG GUGGA	80128	AAUCGAAAGG UUCAAADUGU U	SALIR
グルーアBPI1:		グループSAI2:	
CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BPI1	GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT	2 I A Z
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG	8P111C	AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC	SAIZIC
AAGCCUGUC AGAGGAUGGG UGUGG	BPILICR	AAGACGCAAA UGGCACGUUU CC	SAIZICR
CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU		GCANACCUGC CAUUDGCGBC OU	SAIZR
7 N - 7 H 1 1 1 :	BPIIR	7 N - 7 SA13:	
ACCCATCAAA TIGACCCCAC TI		TECACEATET AGAAATAGAT TETAGAA	E L A Z
	HIII		

7

28	夫	Į.	5-	50	48	89	(3)
----	---	----	----	----	----	----	-----

		34 36 1 0 1	04000 (4)
TTCTACAATC FATTTCTACA TCGTGGA	211112	TTCTGACCIT TCAGTCATAA ACTC	\$P131C
UNCUACAANC BANUUCUACA UEGUGGA	SAISICR	DACACERA ACACACARVA VERC	SPI3ICR
UCCACGAUCU AGAAANACAU UGUACAA	5 A I 3 R	GAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA	SP13R
グループSAI4:		から選択される核酸に異しており且つ 1	5~選択された核
TCTACTTTTA AAGAAACTAG GTT	\$A 1 4	散の最大数のヌクレオチドを含む配列、.	지は
AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA	241410	下記の場合のいずれにおいてもアローブ	が対応する非体的
AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA	SAI41CR	配列と同一のRNA又はDNA裏的とハ	イブリダイズする
UCUAGDUUDA AAGAAACUAG GUD	SA I 4R	という条件下で、	
グルーアSP11:		~・夫々の末端のいずれかに1又は数個の	のヌクレオチドが
GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA	\$211	付加もしくは除去されているか、	
TGCATTACTT CGTCATCTCT CAC	SP111C	・前記配列のいずれかで1個以上のヌク!	レオチドが置換さ
NECYDAYCAN CONCYNCAC CVC	SPILICR	れているか、	
EUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA	SPIIR	・その両方により前紀配列のいずれかと(	異なる変異配列を
グループSPI2:		合むことを特徴とする誇求項1又は2に1	己数のアローブ。
AGGAACTGCC CATTGGTCTT	SP12	4 1種以上の <u>Neisseria</u> g(	norrhoe
AAGACCAATG EGCAGTTECT	SPIZIC	<u>a e</u> 作を検出するためのプローブであって	<b>.</b> .
AAGACCAADG CGCAGUUCCU	SP121CR	- 核酸グループ:	
VECTVECE SYRREDOM	SP12R	グループ NGI1:	
1 N - T SP 13:		CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC	#G11
GAGTTTATER CTGARAGETC ACAR	SP13	CCGAACTAGA ATAACGACGC ATCG	NGILIC

GCGAACUAGA AUAACGACGC	VACC	WC111CR
CCVACCENCE ANYDACAVEA	uccc	MGIIR
グルーアNC12:		
TTCGTTTACC TACCCGTTGA	CTANGTANCC ANAC	NG I 2
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG	GGTAGGTAAA CGAA	NGISIC
COUUCCUUAC UUACUCAACC	CCUACCUAAA CCAA	NGIZICR
BUGGUUACC UACCCGBUGA	CUAAGUAAGC AAAC	NGIZR
から選択される核酸に異	しており且つ15~蔵	択された核
敵の最大数のヌクレオチ	・ドを含む配列、又は	
下記の場合のいずれにお	いてもプローブが対応	する非体的
配列と同一のRNA又は	DNA媒的とハイブリ	グイズする
という条件下で、		
ー・夫々の主義のいずれ	かに 1 女は動館のまな	. + 4 K M

,

- ・夫々の末端のいずれかに1又は数値のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換さ
- ・その両方により終記配列のいずれかと異なる変異配列を 合むことを特徴とするプローブ。
- 5. 生物学的サンアル中で<u>Nelsseria</u> <u>gono</u> rrhoeae様を検出するための方法であって、場合に

よりプローブの集的配列を交叉する(『lanking) 2種のアライマー、より好ましくは進化的に富保存性の 2 種のアライマーを介するポリメラーゼ 厳反応を使用して増 据させた検出すべき株の核散(DNA又はRNA)を必要 に応じて連切な変性条件下でハイブリダイゼーションでき るようにしておいた前記生物学的サンプルを、プローブと サンアル中に存在し得るNelsseria Rogor r.h.o e.a.e.株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーショ ンを可能にする条件下で就求項4に記載のアローブと接触 させる股階と、特にサンプル中に存在し得るNeisse <u>ria</u> <u>gonorrhoeae</u>株のDNA及びRNAの 両方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッド が形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特 復とする方法。

6.ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1× SSC=0.15M NaCl.0.015Mクエン数ナ トリウム、pH7、0)、約25mMのリン教経療液pH 7.1、20%数イオン化ホルムアミド、0.02%Fi coll、0、02%ウシ血液アルブミン、0、02%ポ リビニルピロリドン及び約0.1mg/m1の剪断変性サ

ケ精子DNAを大客しており、及び/又は洗浄媒体が、約 3×55C、25mMリン酸銀賃液pH7、1及び20% 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプロ ーブが請求項4に記載のアローブのいずれかであり、ハイ プリダイゼーション温度が約50℃の範囲及び/又は洗浄 進度が約50℃の範囲に適宜調節され、特に、前記帳的配 列と対応する騒当ハイブリダイゼーション温度(HT)及 び洗浄温度(WT)が夫々、

GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

۲

HT及び/又はWT:50℃、

GBUUGEUUAC BUAGBCAACG GGUAGGUAAA CCAA

HT及び/又はWT:50℃であることを特徴とする請求 項5に記載の生物学的サンアル中で N.e.isseria <u>EODOFFhoeae</u>を検出するための方法。

- 7、生物学的サンアル中で多数、好ましくは全Neiss eria gonorrhoeae#fin vitro 技出するためのキットであって、
- 腹束項4に記載のアローブのいずれかから選択された少 なくとも1種のプローブと、
- ーこれらのプローブと多数、好ましくは会Neisser

ia gonorrhoeae株のDNA及び/又はRN Aとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせること が可能な観査液又は該緩鬱液を生成するために必要な成分

特表平5-504889 (4)

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを遺跡検出するための手及とを含むか、又は
- ~同一核酸分子を集的にし、少なくとも1職が <u>Neiss</u> eria gonorrhoeaeに対して特異的であり 且つ請求項4に記載のプローブのいずれか1覆から選択さ れた少なくとも2種のアローブと、
- これらのアローブと<u>Neisseria gonorr</u> <u>hoese</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリ ダイゼーション反応を生じさせることが可能な維養液又は 蘇緩療液を生成するために必要な成分と、
- 一前配ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを遺時検出するための手段とを含むか、又は
- 固体支持体に固定された請求項4に記載のアローブのい ずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、
- 該プローブの集的配列を含む D N A 及び/又はR N A の 酵素的増額を適時実施するために必要なプライマーと、

CHUCHUGGUC AAGUGUGACG UC

-	鮮	*	89	增	蝠	が	Ħ	ĸ	で	ħ	7	及	U	i'	Z	ij	=	n	ာ်	n	ブ		-	7	۲
И	<u>.</u> g	i	s	s	٤	r	i	а	-	g	0	n	0	r	r	b	0	e	8	Ş.	体	n	D	N	A
R	v	•	ᆽ	は	R	N	A	٤	n		E	^	ጘ	7	ŋ	y	1	ぜ	-	シ	,	v	反	吃	ŧ
生	٢	*	ŧ	ĕ	2	Ł	が	ŦŢ	舵	¢	緩	新	液	又	ij	Ħ	緩	黄	液	ŧ	<b>£</b>	民	ţ	å	た
ø	۴	£	更	ţ	成	分	٤																		

- 一顆配ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを運時後出するための手段とを含むことを特徴とするキッ
- 8.1種以上のNeisseria meningiti dis株を検出するためのプローブであって、

- 核壁グループ:

GACGUEACAE UNGACCAAGA AC

グルーアKKI1:

CETCAACTET	GACGTCGCCC	TG	HHII
CAGGGGGACG	TEACACTTGA	cc	HAIIIC
CAGGGGGACG	UCACACOUCA	cc	NMI11CR
GGUCAAGUGU	GAEGUCGCCC	UC	NKIIR
グループNHI	2:		
сттсттєстс	AAGTGTGACG	TC	NH12
GACGTCACAC	TTGACCAAGA	AC	NMI21C

*****	ANGUGUERCO	VC	
グループNK	13:		
GCGTTCGTTA	TAGCTATCTA	CTGTGC	HH13
GCACAGTAGA	TAGCTATAAC	CAACGC	<b>KNJ3</b> [C
GCACAGUAGA	UAGCUAUAAC	GAACGC	NM131CR
CEGUOCGUUA	DAGCUAUCUA	CUCUGC	NHI3R
グループNHI	14:		
TGCGTTCGAT	ATTECTATET	ACTGTGCA	NKI4
TECACAGTAG	ATAGCAATAT	CGAACGCA	NKI41C
UGCACAGUAG	AUAGCAAUAU	CGAACGCA	NN[4]CR
neceancevn	ADUGCUAUCU	ACUGUGCA	HHI4R
グループNKI	5:		

TITTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT AATGGAACAGAATCCATTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAA NH151C AAUGGAACAGAAUCCAUUCAGGGCGACGUCACACUUGACCAAGAACAAA

UBUUGUUGUUGGUCAAGDGUGACGUCGCCCUGAAUGGABUCUGUUCCAUU

NHI2R

NKIZICR

特表平5-504889 (5)

TTTTCCCTAAC ATTCCCTTGA CTAGAACATC ACAC NMIS
CTCTCATCTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA NMISIC
CUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA NMISICR
UUUUGCCUAAC AUUCCGUUGA CUAGAACAUC AGAC NMISR
から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核酸の最大敗のヌクレオチドを含む配列、又は
下配の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非常節配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリグイズするという条件下で、

7

グループNHIB:

۶

- · 夫々の末端のいずれかに1又は数値のまクレオチドが 付加もしくは除去されているか、
- ・前記配列のいずれかで 1 傷以上のヌクレオチドが重視されているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特徴とするプローブ。
- 9. 生物学的サンプル中でNeisseria meni ngitidis 株を検出するための方法であって、場合によりプローブの裏的配列を突叉する2種のプライマー。 より舒ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介

するポリメラーゼ鎮灰店を使用して増幅させた検出すべき 株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて連切な変性 条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた 前記生物学的サンアルを、アローブとサンアル中に存在し 得る<u>Neisseria meningitldis</u>株の 相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする 条件下で請求項8に記載のプローブと接触させる段階と、 特にサンプル中に存在し得るNelsseria men <u>ingitidis</u>株のDNA及びRNAの両方とハイブ リダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された 場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。 10、ハイブリデイゼーション媒体が、約3×SSC(1 ×SSC=0.15M NaCl.0.015Mクエン酸 ナトリウム、pH7、0)、約25mMのリン酸繊糖液中 H7.1、20%酸イオン化ホルムアミド、0.02%F icoll、0.02%ウシ血清アルブミン、0.02% ポリピニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪額変性 サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、 **約3×SSC、25mMリン酸緩賃液pH7.1及び20** %酸イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア

ローブが請求項8に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリグイゼーション温度が約40~58℃の範囲及び/ 又は洗浄温度が約40~58℃の範囲に適宜調節され、特に、前記事的配列と対応する該当ハイブリグイゼーション 温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

CAGGGCGACG TCACACTTGA CC

HT及び/又はWT:45℃.

GACGTCACAC TIGACCAAGA AC

HT及び/又はWT:45℃、

CCACACTAGA TAGCTATAAC GAACGC

HT及び/又はWT:40℃.

TECACACTAG ATACCAATAT CCAACCCA

H T 及び / 又は W T : 48℃、

TTTTGTTCTTGGTCAAGGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

HT及び/又はWT:58℃、

CTCTCATCTT CTAGTCAACC CAATGTTAGG CAAA

HT及び/又はWT:50℃であることを特徴とする指求 項5に記載の生物学的サンプル中でNeisseris

meningitidisを検出するための方法。

11. 生物学的サンアル中で多数、好ましくは全<u>Neis</u>

seria meningitidis構をin vit ro検出するためのキットであって、

ー請求項 8 に記載のプローブのいずれかから選択された少 なくとも 1 種のプローブと

ーこれらのアローブと多数、軒ましくは全Neisserie meningitidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩慢液又は鼓緩慢液を生成するために必要な成分と

前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を無的にし、少なくとも1種がNeisseria meningitidlsに対して特異的であり且つ請求項8に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、

- これらのアローブと Neisserla mening itidis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブ リダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩害液又 は該緩衝液を生成するために必要な成分と.

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

#### 特表平5-504889 (6)

ドを連時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項4に記載のアローブのいずれかから裏訳された少なくとも1 種のアローブと、

- 禁プローブの褒的配列を含む D N A 及び/又は R N A の 酵素的増築を遺跡実施するために必要なプライマーと。

一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Neisseria meningitidis 株のDN A及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応 を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成する ために必要な成分と

ー前紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

12.1程以上の<u>Haemophilus</u> <u>ducrey</u> <u>i</u>株を検出するためのアローブであって、

- 核酸グループ:

グループBDI1:

TTATTATGCC CGAGGCATAT TC 8D11

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA HDJ11C

CAAUAUGCCU CGCGCAUAAU AA BD11CR

る Haemophilus ducreyi 株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項12に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンプル中に存在し得る Haemophilus ducreyi 株の DNA 及びRNA の両方とハイブリグイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

14.ハイブリゲイゼーション媒体が、約3×SSC(11×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液pH7.1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%ドicoll、0.02%ウシ血液アルブミン、0.02%ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの雰衝変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7.1及び20%設イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項12に配載のプローブのいずれかであり、ハイブリゲイゼーション温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜舞節され、特に、前起線的配列と対応する該当ハイブリゲイゼーション温度(HT)

BUAUDAUGEG CCAGCCAUAD UC

BDIIR

から選択される核酸に属しており且つ15~離択された核 酸の最大数のメクレオチドを含む配列、又は 下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非体質

配列と同一のRNA又はDNA機的とハイブリグイズするという条件下で、

・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか。

・前記配列のいずれかで1個以上のメクレオチドが置接されているか。

· その両方により前記配所のいずれかと異なる変異配列を もむことを特徴とするプローブ。

13. 生物学的サンアル中で Haemophilus ducrevi 株を検出するための方法であって、場合に よりプローブの額的配列を突叉する2種のプライマー、よ り好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介す るポリメラーゼ類反応を使用して増幅させた検出すべき株 の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条 件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた的 配生物学的サンアルを、プローブとサンアル中に存在し得

及び流浄温度(WT)が夫々。

CAATATCCCT CGCGCATAAT AA

HT及び/又はWT: 40℃であることを特徴とする請求 項13に記載の生物学的サンアル中でHaemophil us ducreyiを検出するための方法。

15、生物学的サンアル中で多数、好ましくは企<u>Ha.em.ophilus ducreyl</u>株を<u>in vitro</u>株 出するためのキットであって、

- 禁求項12に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

- これらのアローブと多数、好ましくは全<u>Haemophilus ducrey</u>1株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は鉄緩衝液を生成するために必要な成分と、

一瞥記パイプリダイゼーションにより形成されたパイプリッドを御跡増出するための手段とを会せか、又は

- 同一核酸分子を集的にし、少なくとも1 種が <u>Haemo</u>philus <u>ducreyi</u>に対して特異的であり且つ 請求項1 2 に記載のプローブのいずれか1 種から選択された少なくとも2 種のプローブと、 ۲

- 初記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項 1 2 に記載のアローブの いずれかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、

- 鉄プローブの駅的配列を含む D N A 及び/又は R N A の 静素的増級を連時実施するために必要なプライマーと、

一群果的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと <u>Haemoph() us ducrey</u> 作のDNA及び /又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じ させることが可能な緩痩液又は旅緩療液を生成するために 必要な成分と。

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運動検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

16.1種以上の<u>Branhamella</u> <u>catarr</u> <u>halls</u>株を検出するためのプローブであって、

· その同方により許記配列のいずれかと異なる交換配列を 合むことを特徴とするプローブ。

17. 生物学的サンアル中で<u>Branhamelia</u> c atarrhalis株を検出するための方法であって、 場合によりプローブの個的配列を交叉する2種のプライマ 一、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマー を介するポリメラーゼ銀反応を使用して増幅させた検出す べき体の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて遺切な 変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしてお いた前記生物学的サンアルを、アローブとサンアル中に在 在し得る<u>Branhamella catarrhali</u> <u>5</u>株の根補的核骸との間のハイブリダイゼーションを可能 にする条件下で請求項16に記載のアローブと接触させる 股階と、特にサンプル中に存在し得る<u>Branhamel</u> la catarrhalis株のDNA及びRNAの両 方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが 形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴 とする方法。

18. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×5SC (1 ×SSC=0.15M NaC1.0.015Mクエン酸 - 核酸グループ:

グルーアBCi1:

TTAAACATCT TACCAAAG 8C11
CTTTGGTAAG ATCTTTAA BC11IC
CUUUGGUAAG AUGUUWAA BC11ICR
UUAAACAUCU UACCAAAG 8C11R

1ルーアBC12:

TIGATETITA AACTIGETIE GIGGA BC12
TCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA BC12ICR
UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA BC12R

から裏択される核酸に属しており且つ 1.5 〜 選択された核 酸の最大数のヌクレオチドを合む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非様的 配列と同一のRNA又はDNA線的とハイブリダイズする という条件下で、

- · 夫々の末嶋のいずれかに1又は数伽のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

・ 教記配列のいずれかで 1 個以上のヌクレオチドが置換されているか、

ナトリウム、pH7・0)、約25mMのリン酸緩衝液 PH7・1、20%酸イオン化ホルムアミド、0・02% Ficoll、0・02% ウシ血清アルブミン、0・02% ボリビニルビロリドン及び約0・1mg/m1の剪断性が、物3×SSC、25mMリン酸緩衝液pH7・1及び20%酸イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが請求項16に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30~42℃の範囲とびノスは洗浄温度が約30~42℃の範囲に適宜質節され、特に、背記標的配列と対応する数当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が央々、

CTTTGGTAAG ATCTTTAA

H T 及び/又はwT:30℃

TCCACCAAGE AAGTTTAAAC ATCAA

H T 及び / 又は W T: 42 でであることを特徴とする第収項17 に記載の生物学的サンプル中で B r a n h a m e l l a catarrhalis を検出するための方法。
19. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 B r a n h a m c l l a catarrhalis 株を i n y i

<u>t r o</u>検出するためのキットであって、

į.

- 請求項16に記載のアローブのいずれかから選択された 少なくとも1番のアローブと、

ーこれらのプローブと多数、好ましくは全<u>Branbam</u> <u>ella</u> <u>catarrhalis</u>株のDNA及び/又は RNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせる ことが可能な報情液又は該級資液を生成するために必要な 成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運動検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を概的にし、少なくとも1種が<u>Branh</u> <u>amella</u> <u>catarrhalis</u>に対して特異的で あり且つ請求項16に記載のプローブのいずれか1種から 超択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのアローブと Branhamella cata <u>rrhalis</u>株の DNA 及び/又はRNA との間にハイ ブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩構液 又は鉄緩衝液を生成するために必要な成分と

一前紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを選時検出するための手段とを含むか、又は

から選択される核酸に異しており且つ 1 5 ~選択された核 酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非体的 配列と同一のRNA又はDNA目的とハイブリダイズする という条件下で、

一・夫々の末端のいずれかに1又は数階のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか。

育記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか。

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 合むことを特徴とするプローブ。

21. 生物学的サンアル中でBordetella pertussis株を検出するための方法であって、場合によりプローブの概的配列を夾叉する2種のプライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライマーを介するポリメラーゼ鍼反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学のサンプルを、プローブとサンアル中に存在し得るBordetella pertussis株の相補的

特表平5-504889(8)

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運時検出するための手段とを含むことを特徴とするキッ

20.1種以上の<u>Bordetella</u> <u>Pertuss</u> js株を検出するためのアローブであって、

- 核앞グループ:

グループBPI1:

CEACACCEAT CETETGACA GGETT BP11

AAGCETGTCE AGAGGATGGG TCTGG BP111C

AAGCEUGUCE AGAGGAUGGG UGUGG BP111CR

CCACACCCAU CEUGGGACA GGEUU BP11R

核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で請求項20に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンブル中に存在し得る<u>Bordetella</u> <u>Pertussis</u>株のDNA及びRNAの両方とハイブリデイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特像とする方法。

22. ハイブリダイゼーション螺体が、約3×5 SC(1××5 SC=0.15M NaCl,0.015Mクエン酸
ナトリウム、PH7.0)、約25mMのリン酸経賃液PH7.1.20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll,0.02%ウシ直流アルブミン、0.02%Ficoll,0.02%ウシ直流アルブミン、0.02%Ficoll,0.02%ウシ直流アルブミン、0.02%Fがリビニルピロリドン及び約0.1ms/mlの野断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸解債液PH7.1及び20%脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項20に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び/又は洗浄温度が約55℃の範囲に適宜質節され、特に、額記職的配列と対応する数当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

## AACCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG

Ł

HT及び/文はWT:55℃であることを特徴とする請求 項21に記載の生物学的サンプル中で<u>Bordetell</u> a <u>pertussis</u>を検出するための方法。

23. 生物学的サンアル中で多数、好ましくは全<u>Bord</u> <u>etella</u> <u>pertussis</u> # \* \* \* | <u>N</u> <u>vitro</u> 被出するためのキットであって、

- 背求項 2 0 に記載のアローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のアローブと、

- これらのプローブと多数、許ましくは全<u>Bordete</u>

<u>Ila pertussis</u>株のDNA及び/又はRNA
との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが
可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、
- 背紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むか、又は

- 関一検散分子を標的にし、少なくとも1種が<u>Borde</u> <u>tells pertussls</u>に対して特異的であり且 つ請求項20に記載のアローブのいずれか1種から選択さ れた少なくとも2種のアローブと、

- ch 60 TD - TE Bordetella pertu

特表平5-504889 (9)

8.5.1.5.株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリタイゼーション反応を生じさせることが可能な緩鬱液又は鉄緩震液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを渡時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された背求項20に記載のプローブの いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- 該アローブの銀的配列を含む D N A 及び/又は R N A の 酵素的増額を譲時実施するために必要なアライマーと、

- 酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Bordetella pertussis 体のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生 じさせることが可能な緩慢液又は禁緩黄液を生成するため に必要な成分と、

一割記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを遠時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

# 24.1種以上の<u>Haemophilus influe</u> <u>nzae</u>権を検出するためのプローブであって.

## - 核酸グループ:

グループ#111:

ACCCATCANA TIGACCCCAC IT HIII
AACTGCCCTC AATTTGATGC GT BIIIIC

AACUCCCGOC AAUFUGAOGC GD HITTICR

ACGCAUCAAA BUGACCGCAC BU BIIIR

グループ#112:

ACTITICART CARARCTIAN AG HIIZ

CITTAAGITT TCACTTCAAA GT BIJZIC

CHUHAAGUBU BCACUUCAAA GU BIIZICR

ACUUUCAACU GAAAACUUAA AG HII2R

から選択される核酸に属しており且つ 1.5~選択された核 酸の最大数のメクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾 配列と同一のRNA又はDNA線的とハイブリダイズする という条件下で、

ー・夫々の末端のいずれかに1又は数僧のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、 ・前紀配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 合むことを特徴とするプローブ。

25. 生物学的サンアル中で Haemophilus i <u>n f l u e n z a e</u>株を検出するための方法であって、場 会によりプローブの根的配売を交叉する2種のプライマー、 より好ましくは誰化的に高保存性の2種のアライマーを介 するポリメラーゼ無反応を使用して増幅させた検出すべき 株の核酸(DNA艾はRNA)を必要に応じて流切な変性 条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた 背配生物学的サンアルを、アローブとサンアル中に存在し 得るHaemophilus <u>influenzae</u>株の 相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする 条件下で請求項24に記載のプローブと接触させる段階と、 特にサンプル中に存在し得る<u>Haemophilus</u> <u>i</u> <u>nfluenzae</u>株のDNA及びRNAの両方とハイブ リダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された 場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。 26、ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1

× S S C = 0 . 1 5 M Na C I , 0 . 0 1 5 M クエン酸ナトリウム、 p H 7 . 0 ) 、約 2 5 m M のリン酸緩衝液 p H 7 . 1 、2 0 %以イオン化ホルムアミド。0 . 0 2 % F i c o 1 I , 0 . 0 2 % ウシ血液アルブミン。0 . 0 2 % F i c o 1 I , 0 . 0 2 % ウシ血液アルブミン。0 . 0 2 % ポリビエルピロリドン及び約0 . 1 m s / m 1 の蜉蝣変性サケ精 テ D N A を含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3 × S S C 、 2 5 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 1 及び 2 0 %酸イオン化ホルムアミドを含有しており。使用されるアローブが請求項 2 4 に配載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約3 5 ~ 5 5 ℃の範囲及び/又は洗浄温度が約3 5 ~ 5 5 ℃の範囲及び/又は洗浄温度が約3 5 ~ 5 5 ℃の範囲及び/又は洗浄温度が約3 5 ~ 5 5 ℃の範囲に減立調節され、特に、前記額的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(H T ) 及び洗浄温度(W T ) が夫々、

AAGTGCEGTC AATTTGATEE GT

HT及び/又はWT:55℃、

CTTTANGTTT TCACTTCANA GT

ドT及び/又はWT:35℃であることを特徴とする請求 項25に記載の生物学的サンブル中で<u>Haemophil</u> <u>US influenzac</u>を検出するための方法。

27.生物学的サンプル中で多数、好ましくは全Haem

特表平5-504889(10)

ophilus influenzae舞をin vit ro散出するためのキットであって、

~ 請求項 2 4 に記数のプローブのいずれかから選択された 少なくとも 1 種のプローブと、

- これらのプローブと多数、好ましくは全<u>日 a e m o P h</u>
<u>i l u s j n f l u e n z a s</u>株のD N A 及び/又は R
N A との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な観響液又は該観響液を生成するために必要な成

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一枝酸分子を振的にし、少なくとも1 腹が Heemophilus influenxaeに対して特異的であり且つ請求項24に記載のプローブのいずれか1 種から選択された少なくとも2種のプローブと、

- これらのアローブと Haemoph lus influenzae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリグイゼーション反応を生じさせることが可能な報告液又は該種債液を生成するために必要な成分と、

一数記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

ドを連時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項24に記載のプローブの いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- 簱プローブの領的配列を含む D N A 及び/又は R N A の

蘇索的増額を道時実施するために必要なプライマーと、

一辞業的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと <u>ドaemophiiys influenzae</u>株のDN A及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応 を生じさせることが可能な緩衝液又は棘緩衝液を生成する ために必要な成分と、

- 背記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手及とを含むことを特徴とするキット。

28. 1種以上の<u>Streptococcus Pneu</u> monjae姓を検出するためのプローブであって、

- 核酸グループ:

グループSPI1:

GTGAGAGATC ACCAAGTAAT GCA SFII

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC SPILIC

UCCAUDACUD GGOGAUCUCU CAC SPILICR

GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA SPIJR

グループ SP12:

AGGAACTGCG CATTGGTCTT SPIZ

AAGACCAATG EGCAGTTECT SPIZIC

AACACCAAUG CGCAGUUCCU SPIZICR

グループSPI3:

ACCAACUGEG CAUUGGUCUU

GAGTTTATCA CTGAAAGGTC AGAA SPI3

TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC SPISIC

DUCUGACCUB UCAGOCABAA ACUC SPI31CR

CACUBUAUGA CUCANAGGUC AGAA SPI3R

から 銀択される 核酸に 腐しており且つ 1.5~ 選択された核酸の 最大数の ヌクレオチドを含む 配列、又は

SPIZE

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾 配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズする という条件下で、

- · 夫々の末端のいずれかに1又は数値のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

・特記区列のいずれかで1億以上のヌクレオチドが置接されているか。

・その両方により育記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特徴とするプローブ。

29. 生物学的サンプル中で<u>Streptococcus</u> <u>pneumoniae</u>株を検出するための方法であって、 場合によりアローブの裏的配列を夾叉する2種のプライマ - 、より好ましくは進化的に高保存性の2種のアライマー を介するポリメラーゼ鎮反応を使用して増幅させた検出す べき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて重切な 変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしてお いた前記生物学的サンアルを、アローブとサンアル中に存 在146<u>Streptococcus pneumoni</u> a.c.株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可 姓にする条件下で請求項28に記載のプローブと接触させ る段階と、特にサンプル中に存在し得る<u>Streptoc</u> occus preumoniae # o D N A & URNA の資方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッ ドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを 糖療とする方法。

30. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×5SC (1 ×SSC=0.15M NaC1, 0.015Mクエン酸 特表平5-504889 (11)

ナトリウム、PH7・0)、約25mMのリン酸緩衝液PH7・1、20%脱イオン化ホルムアミド、0、02%F(coll、0.02%ウシ森清アルブミン、0、02%ポリピニルピロリドン及び約0・1ms/mlの剪断変性サケ糖子DNAを含有しており、及び/又は洗浄塩体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液PH7・1及び20%酸イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるプローブが請求項24に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲に濃度調節され、特に、前記線的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

TECATTACTT GETGATCTCT CAC

HT及び/又はWT:45℃、

AAGACCAATE CECAGTTCCT

**HT及び/又はWT:45℃、** 

TTETGACETY TEAGTCATAA ACTE

HT及び/又はWT: 45℃であることを特徴とする確求 項29に記載の生物学的サンブル中でStreptoco ccus pneumoniseを検出するための方法。

3 l . 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全<u>Stre</u> ptococcus pneumoniac<sup>株を</sup>in ソ <u>itro</u>後出するためのキットであって、

- 請求項28に記載のアローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のアローブと、

ーこれらのプローブと多数、好ましくは全<u>Streptococcus</u> Pneumoniae 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩慢液又は酸緩慢液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ー同一検散分子を振的にし、少なくとも1種が<u>StreP</u> tococcus pneumonlaeに対して特異的 であり且つ請求項28に記載のプローブのいずれか1種か ら選択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのプローブと<u>Streptococcus</u> <u>PREUMonise</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な報賃 核又は該額者液を生成するために必要な成分と、 -- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運動検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項 2 8 に記載のアローブの いずれかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、

- 鉄プローブの標的配列を含むDNA及び/又はRNAの 験索的増幅を遺跡実施するために必要なアライマーと、

一脚果的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと <u>Streptococcus PReumoniae</u>様の DNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション 反応を生じさせることが可能な維質液又は鉄線衝液を生成 するために必要な成分と、

ー前紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

32.1種以上の<u>Streptococcus agal</u> <u>actiae</u>株を検出するためのプローブであって、

- 核酸グループ:

グループSAI1:

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T

SAII

AACAATTTGA ACCTTTCGAT T

SAILIC

AACAAUUUGA ACCUDUCGAU U SAILICR AAUCGAAAGG UUCAAAUUGU U SAIIR

グループSAI2:

GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT SA12

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC SAIZIC

AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC SAIZICR

GGAAACCUGC CAUUUGCGUC UU SAIZR

グループSAI3:

TCCACGATCT AGAAATAGAT TGTAGAA SAIS

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA SAIBIC

BUCUACAAUC UABUUCUAGA UCGUGGA SAIBICR

UCCACGAUCU AGAAAUAGAU UGUAGAA SAIBR

グループSA14:

TETACTITTA AAGAAACTAC GTT SAL4

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA SA141C

AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA SAI4ICR

UCUAGUUUUA AACAAACUAG GUU SAI4R

から選択される核酸に裏しており且つ15~選択された核 · 酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非接触

特表平5-504889 (12) 配列と同一のRNA又はDNA標的とハイブリダイズする という条件下で、

ー・夫々の末端のいずれかに1又は数値のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1億以上のヌクレオチドが置換されているか。

・その関方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 合むことを特徴とするプローブ。

33. 生物学的サンブル中で <u>Streptococcu</u>
<u>a agalactiae</u>株を検出するための方法であって、場合によりプローブの標的配列を突又する2種のプライマー、より好ましくは遊化的に高保存性の2種のプライマーを介するボリメラーゼ値反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて遺のな変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前配生物学的サンブルを、プローブとサンブル中に存在し得る<u>Strept</u>を可能にする条件下で請求項32に記載のプローブと接触させる段階と、特にサンブル中に存在し得る<u>Strept</u>

ococcus <u>a galactiae</u>株のDNA及びRNAの関方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

**HT及び/又はWT:35℃**.

AACAATTTGA ACCTTTCGAT T

AAGACCCAAA TGGCAGGTTT CC

HT及び/又はWT:45℃、

TICTACANTO TATITOTAGA TOGTEGA

HTRU/XLWT: 45°C.

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA

H T 及び/又はW T: 37であることを特徴とする讃求項39に配戦の生物学的サンブル中で Streptococcus agalactise 株 世 は t cocccus agalactise 株 き i n シ i t r o 検出するためのキットであって、

- 請求項32に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、

- これらのプローブと多数、好ましくは会<u>Strepto</u> <u>coccus</u> <u>agalactlae</u>株のDNA及び/又 はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせ ることが可能な頻繁液又は貧緩鬱液を生成するために必要 な成分と、

一前紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を振的にし、少なくとも1 種が<u>StreP</u>
tococcus <u>a galactiac</u>に対して特異的
であり且つ請求項32に記載のアローブのいずれか1種か
ら選択された少なくとも2種のアローブと、

- これらのプローブと Streptococcus BE alactiae 体のDNA及び/又はRNAとの間にハ イブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な報告 液又は難緩者液を生成するために必要な成分と、

- 打犯ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを宣映検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された指求項32に記載のプローブの いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- 該アローブの個的配列を含むDNA及び/又はRNAの 酵素的増額を連伸実施するために必要なプライマーと、

一种素的増額が可能であり及び/又はこれらのアローブと <u>Streptococcus</u> <u>Agalactiae</u>作の DNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション 反応を生じさせることが可能な被害液又は該被害液を生成 するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

特表平5-504889 (13) ド生達時検出するための手及とを含むことを特徴とするキッ

36.1種以上のCampylobacter jejuni及びCampylobacter colli 体を検出するためのアローブであって、アローブが適切な条件でCampylobacter jejuni及びCampylobacter jejuni及びCampylobacter jejuni及びCampylobacter jejuni及びCampylobacter colli 由来のDNA及び/又はRNAのみとハイブリディズし、他の生物由来のDNA及び/又はRNAとはハイブリディズしないという条件下で、図10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から誘導される15~最大数のメクレオチドの配列又はその相補配列を含むことを特徴とするアローブ。

37. 生物学的サンアル中で Campylobacter jojuni及び Campylobacter col i 株 を検出するための方法であって、場合によりプローブの無的配列を失叉する 2 種のアライマー、より好ましくは進化的に高保存性の 2 種のアライマーを介するボリメラーゼ値反応を使用して増幅させた検出すべき株の核酸(DNA X は RNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリディゼーションできるようにしておいた前記生物学的サ

ンプルを、プローブとサンプル中に存在し得る Campy loba cter jejuni及び Campy loba cter coli 株の相補的核酸との間のハイブリデイゼーションを可能にする条件下で請求項36に記載のプローブと機触させる段階と、特にサンブル中に存在し得る Campy lobacter jejuni及び Campy lobacter coli 株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

38. 生物学的サンアル中で多数、好ましくは全<u>Campylobacter</u> jejuni及び<u>Campylobacter</u> coli tein vitro 検出するためのキットであって、

- 請求項36に記載のアローブのいずれかから選択された 少なくとも1番のアローブと、

ーこれらのプローブと多数、好ましくは全<u>Campylo</u> <u>bacter</u> <u>jejuni</u>及び<u>Campylobact</u> <u>er coli</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイ ブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩奪液 久は該縁皆液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを避時検出するための手段とを含むか、又は

- 同一核酸分子を緩的にし、少なくとも1 種が <u>Campy</u> <u>lobacter</u> <u>leluni</u>及び <u>Campyloba</u> <u>ster</u> <u>coli</u>に対して特異的であり且つ請求項36 に起載のアローブのいずれか1種から選択された少なくと **6**2種のアローブと、

- これらのアローブと Campylobacter Je juni及び Campylobacter coli 様の DNA及び/又はRNAとの間にハイブリデイゼーション 反応を生じさせることが可能な観情被又は該暖情液を生成 するかめに必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運時検出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された請求項36に記載のアローブの いずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、

ー該アローブの傷的配列を含むDNA及び/又はRNAの 酵素的増額を避時実施するために必要なアライマーと、

- 鮮業的増福が可能であり及び/又はこれらのアローブと

特表平5~504889 (14)

Cempylobacter jejuni及びCamp ylobacter colli 株のDNA及び/又はRN Aとの間にハイブリゲイゼーション反応を生じさせること が可能な観響液又は該観費液を生成するために必要な成分 と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット

39、被出すべき微生物に特異的な指求項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のアローブを使用して生物学的サンアル中に含まれる1度の数生物又は数理の数生物を同時にjn vi まての検出するための方法であって、好ましくはアローブ 保城を使用して、生物学的サンアル中に存在する(概例的配列を含む)DNA及び/又はRNAを振識し、増幅した個的配列と酸上のプライブリグイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドアローブを懸知の位置にドットスポットした膜に約記生物サンアルを検触させ、ハイブリダイゼーションにより

形成されたハイブリッドを適切な手段により検出すること を特徴とする方法。

40. 生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は数 種の微生物を同時に<u>in</u> <u>vitro</u>検出するためのキットであって、

- 検出すべき数生物に特異的であり、原にドットスポット した請求項1から4、8、12、16、20、24、28、 32及び36のいずれか一項に記載のプローブの少なくと

- 該アローブの限的配列を含む DNA及び/又はRNAの 歴史的機能を当時実施するために必要なプライマーと、

一脚素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと 検出すべき微生物のDNA及び/又はRNAとの同にハイ ブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な観響液 又は核細質液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキッ、.

#### 明显型

16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域から 誘導される非ウイルス微生物検出用ハイブリダイゼーショ ンプローブ

本発明は、ハイブリダイゼーション手順により生物学的 サンプル中で非ウイルス数生物の特異的検出に使用するための、リボソームリボ核数 (rRNA) 遠伝子、特に16 S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー 振城から誘導される核酸プローブに係る。

 貯蔵券命が長く、容易に精製及び標準できる。

DNAプローブ技術を使用して戦生物を確実に診断にするためには、使用されるプローブは高特異性(即ち他の生物に由来する核酸と交差反応すべきでない)且つ高感度(即ち被出しようとする生物の全部ではないとしてもほとんどの株がプローブと反応すべきである)であるべきである。 従って、好道駅的配列は以下の特徴を有するべきである。 (1)配列は該当生物の各株のゲノム中に存在すべきである。

(ii) 進化による配列の相違は、一方では該当種を他の 密接に関連する種から区別できるようにするために十分な 配列相違があり、他方では使用されるプローブで該当種の 全株を検出できるようにするために十分な配列保存がある ように構成されるべきである。

種特異的プローブは多数の生物について記載されている。 最近の文献ではTenover, Clin. Micro biol. Rev. 1:82-101, 1988を参照 されたい。

しかしながら、ゲノム中のどの遺伝子から特異的プロー ブ配列を誘導できるのかについては不明である。プローブ

δ.

開売にあたっては、最終的に対象生物に対して特異的にな るようなフラグメントを得るために大規模な選択手順に従 わなければならないことが多かった(Korolik e t al., J. Gen. Microbiol. 134 :521-529,1988; Grimont et ai., J. Clin. Microbiol. 21: 431-437, 1985; Welcher et a I., Nucl. Acids Res. 14:100 27-10044, 1986; Donegan et al., Mol. Cell. Probes 3:13 -26. 1989; Beaulieu and RO Y. Abstract nr D249. Abstr acts of the Annual Meeting of the American Society f or Microbiology, 1989). ほとん どの場合、特異的フラグメントが誘導される遺伝子の機能 又は実態は解明されておらず、別の特異的アローブが羨望 される毎にスクリーニング手順を手探りで繰り返さなけれ ばならない。上記蓄準を満たし且つ偏在する遺伝子が厳密 に同定されるならば、時間と手間のかかる選択が不要にな

16S又は23SrRNA遺伝子は、既に記載されている方法を使用して配列を容易に得ることができ、職特異的技法を使用して配列を容易に得ることができ、職特異的技法を使用可能なの高係存在遺伝子内に難をので、プローブ研究に使用可能なが知られているので、プローブ研究に対したのの事を区別のようにある。更に、なののは、では、ない場合がある。更に、なののは、でのののではないのでは、ないののでは、ないののでは、ないののではない。ことが多くな要になる。更に、ない、ないののではない。ことが多くな要になる。要は、ない、はなない、ない、はない、はないののでも外れると、はないのののでもから少しでも外れると、はないできる。

使って、16S及び23SrRNA選伝子から特質的プローブを誘導することができなかった概を含むほとんどの生物に程特異的なプローブを開発することができ、好ましくはより広いストリンジェンシー範囲を有する保在達伝子を特徴付けることができるならば、非常に有利である。

各細胞生物は、その転写物がリボソームの機能とタンパ ク質の含成とに不可欠であるため、リボソームRNAシス

トロンを有する。一般に、遺伝子はゲノム中に多葉コピー 存在する。裏正細菌では16SrRNA遺伝子[小サブユ ニットァRNA(srRNA)に餌じ]はrRNAシスト ロンの5、末端に位置し、23SrRNA[大サブユニゥ トァRNA(1ァRNA)に同じ」が後親する。5SァR NA遺伝子はシストロンの3′末悔に位置する。16S、 23S及び5S遺伝子はスペーサー領域により分離され、 これらのスペーサー領域には転写後プロセッシングに関与 する転移RNA(tRNA)遺伝子及びシグナル配列が位 置し得る。まず最初にrRNAシストロンは前駆物質RN A分子として転写される。この一次転写物はエンドリボヌ クレアーゼ及びエキソリポヌクレアーゼにより更にプロセッ シングされ、成熟産物を生成する。従って、スペーサー報 域配列は生物のゲノム中のみに存在するのではなく、首駆 体RNA分子及びプロセッシング産物中にも存在する。実 正細密ァRNAシストロンの精造及びプロセッシングは、 Gegenheimer and Apirion, M icrobiol. Rev. 45:502-541, 1 981に詳細に記載されている。

裏核生物の核ゲノム中の状況は多少異なり、arRNA

及び1 r R N A 間に 5 . 8 S R N A 遺伝子が位置しており、5 S r R N A 遺伝子は別個の長いタンデムアレー中に配置されている(Perry . Annu. Rev. Biochem. 45:605-629. 1976: Longand Dawid. Annu. Rev. Blochem. 49:727-764. 1980)。しかしながら、真核生物のミトコンドリア又はクロロブラスト中のr R N A シストロンは実際に原核生物である(Borstand Grivell. Nature 290:443-444. 1981)。

文献には非常に少数の真核又は原核生物のスペーサー版 域の核酸配列しか配数されていない(例えば Youns et al... J. Biol. Chem. 2.5.4:3
264-3271. 1979: 及び Martens et al... System. Appl. Microbiol. 2:224-230. 1987). これらのデーケから核酸配列保存を確実に予想することはできず、従って、特異的プローブの選択のためのスペーサー領域の適応については全く推定することができない。

より詳細には、真核生物に関して、生物学的サンプル中

特表平5-504889 (16)

で散生物の検出に使用され、16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー環域から誘導されるハイブリダイゼーションアローブは未だに報告されていない。真核生物の大小サブユニットrRNA遺伝子間の対応するスペーサー根域についても何ら解明されていない。

真核生物に関する限り、リボソーム遺伝子スペーサーからクローニングされたフラグメントの使用がLelshmanlaに関する分類学的研究に配数されている(Ramirez and Guevara, Mol. Bloch、Parasitol、 22:177-183. 1987)。しかしながら、使用された領域及び研究のアプローチは、特に以下に述べる理由により、小rRNA及び大rRNA遺伝子間のスペーサー領域から誘導されるプローブを使用するために当業者には無益である。

(i) Ramirez及びGuevaraにより使用されたリボソーム遺伝子スペーサーはsrRNA及びIrRNA間のスペーサー懐城ではなく、2つの隣接するrRNAシストロン間に存在する配列であり、このようなスペーサーは実核生物ではrRNAシストロンの反復単位間にしか見いだされず、srRNA及び1rRNA遺伝子間の内部

( i i ) 遺伝子スペーサーフラグメントを使用する<u>L e i</u>

スペーサーには無関係である。

shmanish分類群間の区別は、制限フラグメントパターンを比較することにより得られ、使用されるフラグメントパタトは非特殊的である。

従って、サザンブロット分析を用いずに簡単なハイブリ ダイゼーションプロトコルを使用してフラグメントで区別 することは不可能である。

リポソーム遺伝子スペーサー中に高特異的アローブが存在し得るということも立証されていない。

従って、本発明の目的は、細菌種のような特定生物のr RNA遺伝子間のスペーサー根紙から誘導される種特異的 プローブを提供することである。

本見明の別の目的は、Neisseria Ronorrhoese、Neisseria meningiti dis Branhamella catarrhali ま、Haemophilus ducreyi、Haem ophilus influenzae、Bordete ila pertussis、Streptococcus

pneumonlae. Campylobacter jejuni及びCampylobacter coli 株を検出するための、165-235rRNAスペーサー 銀城から誘導されるDNAプローブを提供することである。

本発明の更に別の目的は、ドットスポット、質置換、コ ンペティション、サンドイッチ又は进ハイブリダイゼーショ ン試験のようなハイブリダイゼーション試験により生物学 的サンアル中でNeisseria gonorrhoe ae, Neisseria meningitidis, Branhamella catarrhalis, Ha emophilus ducrevi. Haemophi lus influenzae, Bordetella pertussis. Streptococcus as alactise. Streptococcus pne umoniae, Campylobacter jeju ni及びCampylobacter coli株を映出 するための、16S-23SrRNA遺伝子スペーサー根 娘から誘導されるDNAプローブを提供することである。 本発明の更に別の目的は、<u>Neisseria gono</u> rrhoeae, Neisseria meningit

idis. Branhamella caterrhai
is. Haemophilus ducreyi. Hae
mophilus influenzae. Bordet
ella pertussis. Streptococc
us agalactiae. Streptococcu
g pneumoniae. Campylobacter
jeluni及びCampylobacter col
i株のin vitro路額用アローブ及び簡単な路筋方
法を提供することである。

本発明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細菌のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15メクレオチドから構成されるアローブに係る。

本発明はより詳細には、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細胞の r R N A 遺伝子間、特に 1 6 S 及び 2 3 S r R N A 遺伝子間のスペーサー痕域の約 1 5 ヌクレオチド〜ほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくはスペーサー痕域の約 1 5~約 1 0 0 ヌクレオチドから構成されるプローブに係る。

以下の文中で「スペーサー根娘」なる用器は、「RNA連伝子間、より特定的には165及び23STRNA連伝

子間のスペーサー領域を重味する。

本売明は、検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細菌に固有であるように選択された r R N A 遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリダイズするために十分相補的なオリゴヌクレオテドを構築する段階を含む方法で得られるようなハイブリダイゼーションアッセイ用アローブに係り、 r R N A 遺伝子間のスペーサー領域の前記解析は

ー ● 目的生物の r R N A 遺伝子間のスペーサー領域のメクレオチド配列を、最近限程の r R N A 遺伝子間のスペーサー領域のメクレオチド配列と比較し、

\* 最近限数のうちの少なくとも1数の r R N A 遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物の r R N A 遺伝子間のスペーサー領域の少なくとも約15メクレオチド、好ましくはスペーサー領域の約15〜ほぼ最大数のメクレオチド、より好ましくは約15〜約100メクレオチドの配列を選択することにより、又は

- \* 短糖スペーサー領域を得るように、目的生物のスペーサー領域からtRNA遺伝子及び場合によりシグナル配列

関連性の低い程間では顕著な配列相同性は(tRNA配列 を除き)全くないことが判明した。

下記表では、異なる様の16SrRNA配列の相同値(16S hom)(配列相同%)を、スペーサー價級の対応する相同値(スペーサーhom)に比較した。相同値(16S hom及びスペーサーhom)は、Inteiiigentics Inc.及びGenofit SA製PC Geneソフトウェア(1989年4月20日リリース6.01)を使用して計算した。比較したヌクレオチドの総数を括弧内に示す。この結果から明らかなように、スペーサー値線は16SrRNA分子よりも低級存性である。

を欠失させ、

▲少なくとも約15ヌクレオチド、舒ましくは約15~スペーサー 環域のほぼ最大数のヌクレオチド、より舒ましくは約15~約100ヌクレオチドから構成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行錯誤により決定することにより選択される。

本見明は特に、 r R N A 遺伝子間のスペーサー 仮域が 1 6 S r R N A 遺伝子及び 2 3 S r R N A 遺伝子間の転写スペーサー領域であるようなプローブに係る。

退って複数するように、数種の微生物のスペーサー領域をクローニングし、配列決定及び比較した。比較の結果、スペーサー領域の複数配列は高条存性のrRNA遺伝子に比較して半保存性(seei-conserved nature)であることが利明した。従って、スペーサー領域はrRNA遺伝子もれ自体よりもプローブの開発に好道である。図1、2及び10は、高度に関連する生物(例えば両一遺伝種からの高度に関連する株)間に高度の配列相関性があることを示す。図3及び7に示すように、並の関連性を有する生物間では多少大きい配列相違が認められた。図4~6に示すように、

比較株		165	24-9-
株 1	株 2	how	hos
N. gonorrhoese	N. gonorrhoese	99.91	1001
NCTC 8375	1TG 4367	(1484)	(335)
B, pertussis	8. bronchiseptica	1001	98.15
ATCC 10380	NCTC 452	(417)	(582)
M. gonorrhoese	N. meningitidis	995	93.58
NCTC 8375	HCTC 10025	(1452)	(803)
B. caterrhalis	M. goglignefacions	97.91	87.15
ITG 4197	ATCC 19975	(1244)	(498)
B. partussia	N. gonorrhoese	86.31	58.43
ATCC 10380	HCTC 8375	(998)	(582)
I. catarrhalis	N. gonorrhoese	83.85	68.15
ITG 4197	NCTC 8375	(1485)	(498)
I. dusrevi	E. goli	88.85	67.15
CIP 541		(1498)	(846)

この結果、関連する対象病原體(即ち<u>Neisseri</u> <u>a gonorrhoeae</u>, <u>Neisseria me</u> <u>ningitidis</u>, <u>Branhamelia</u> <u>cat</u>

arrhalis. Haemophilus ducre yi. Haemophilus influenzae. Bordetella pertussis. Strep tococcus agalactiae, Strept ococcus pneumoniae, Campylo bacter lejuni AU Campylobact er coli株)のスペーサー銀城配列から程特異性及 び感度の高いアローブを誘導することができた。16S及 び/又は23SrRNA分子中で高特異性アローブを見い だすことができなかった Nelsseria menin gitidis & U Bordetella pertus <u>ましょ</u>種のスペーサー機能からも有用なアローブを誘導す ることができた。本明報書に記載する以外の雅(例えば他 の <u>Campylobacter</u>程、他の <u>Haemophi</u> lus種、Actinobacillus種、Bacte roides程、Chlamydia程等)の特異的アロ ープも同様にスペーサー模域配列から誘導できる。

16 S 及び 23 S r R N A 遺伝子間の転写スペーサー領域から誘導されるプローブの係的は、検出すべき報恵中に存在するゲノム D N A 及び前駆体 R N A 分子である。 背影

この領域をPCR技術によりクローニング及び配列決定するのは簡単であり、同一プロトコルを多種の生物に適用することができる。従ってスペーサー領域の配列は、16S 又は23SrRNAに割り当てられた保存プライマーを使用するrRNA適伝子の酵素的増幅により得られる。スペーサー領域を占めるフラグメントの増幅に使用可能な塩差プライマー丼の例を以下に挙げる。

プライマー対1:TGGCTCAGAT TGAACCCTGG CGGC及び CCTTTCCCTC ACCGTACTGG T

プライマー対 2 : TGGGTGAAGT CGTAACAAGG TA及び CACGTCCTTC GTCGCCT.

増級したフラグメントをそのまま、又は固有制限部位を 認識する制限酵素で消化後に2つのサブフラグメントとし てクローニングすることができる。M13でPCR産物を クローニングするためのストラテジーは、Mediin et al. (Gene <u>71</u>:491-499,198 8)に記載されている。

同一ストラテジーを使用してプラスミドベクターでクロ ーニングすることができる。このアプローチによると、塩 基プライマーの5′末端から固有制限部位を含むヌクレオ 特表平5-504889 (18) カリ、多重コピー存在し得るので

体、RNA分子は一本額であり、多重コピー存在し得るので、 前駆体RNA分子を検出すると有利である。他方、DNA 分子はRNA分子よりも酵素分解を非常に受けにくい。使っ て、ハイブリダイゼーション前にRNA分解を生じないよ うに十分に生物学的サンブルを処理及び/又は保存できな い場合には、DNAターグッティングが好演である。

16S-23SrRNA転写スペーサー領域から誘導されるプローブの別の利点は、ポリメラーゼ値反応(PCR)を使用する影素増額後に額的検出する点にある。多くの散生物のスペーサー領域は例えば、失々16S及び23SrRNA遺伝子の3'末端及び5'末端の保存領域に割り当てられた同一プライマーを使用して脚業的に増幅され得る。rRNA遺伝子の高保存性を利用すると、同一試象及びプロトコルを使用して増速には同時に多数の生物のスペーサー領域を増幅し、その後、該当生物のスペーサー領域を増幅し、その後、該当生物のスペーサー領域に特異的にターゲッティングするプローブを使用して増低フラグメントを検出することができる。同時に増幅されたフラグメントを検出することができる。同時に増幅されたフラグメントの同時且つ特異的検出のために有利な方法は、逆ハイブリディゼーションである。

スペーサー保崎は保存配券により夾叉されているので、

チド配列を伸長させ、フラグメントを用方向にクローニングする。プラスミドベクターにクローニング後、ジデオキシチェーンターミネーション法を使用してスペーサー領域を配列決定することができる。

このアプローチはゲノムバンク又は遊択された制限エンドヌクレアーゼフラグメントを使用する従来のクローニング手環に比較して著しく簡単で時間がかからない。

クローニングせずにPCRフラグメントで配列決定反応 を直接実施すると、より迅速に配列情報が得られるが、クローン化フラグメントから生成された配列情報のほうがより正確且つ完全である。PCRフラグメントに比較して、クローン化遺伝子フラグメントは容易に大量精製できるので、配列決定段階を明瞭に読み取ることができる。プローブ配列中に1つでもミスマッチがあるとプローブは無効になるので、配列を得る際には遠度よりも特度のほうが著しく優先される。

上記に要称したアプローチによりスペーサー配列を得る 容易さを考慮すると、プローブが所望される生物のスペー サー領域のメクレオチド配列を最近開発のスペーサー領域 のメクレオチド配列と比較するのが、特異的プローブ配列

#### 特表平5-504889 (19)

を誘導するために好達な方法である。

最近限額とは、DNA相同の点で最も密接に関連すると とが知られており且つ該当生物と区別されなければならな い分類群を写味する。

該当生物の分類学的位置に依存して、最近期程は該当生 物に非常に高度に関連し、結合度が75%以上であっても よいし、関連度が低く、有効なDNA相間百分率を示さな くてもよい。初期再生レート法では結合度の値は約30% 以下であり、固根DNA:DNAハイブリディゼーション 法ではDNA相同は更に低く、10~20%の結合度にな **8.**..

一方、該当生物を区別すべき最近開復のヌクレオチド配 **列を入手できない場合には、試行錯誤により特異的アロー** ブを選択することができる。その場合、スペーサー領域の 任意の場所に位置し得る特異的プローブ領域を各生物毎に 実験的に定義しなければならない。tRNA遺伝子やシグ ナル配列のようなスペーサー領域中のほんのわずかの領域 しかプローブ最級として先数的に除外できない場合もある。 しかしながら、16S-23SrRNAスペーサー模様は 一般に小さく、進常900bp以下であるので、大規模に

スクリーニングしなくても良好なアローブ配列を容易に見 いだすことができる。

例えば16S及び23SrRNA遺伝子間の700bp のスペーサー保坡の場合、tRNA及びシグナル配列を欠 失させることにより得られる「短縮」スペーサー値値は約 500bゃであり得る。

本明維書中に使用する「生物学的サンアル」なる用語は、 該当体的配男が探査される臨床サンアル(膿、瘕、血液、 **泉等)、環境サンプル、観奮コロニー、汚染又は純粋培養** 物、精製技能等のような試料を意味する。

本明観書中に使用する「FRNA遺伝子スペーサー領域 から誘導」なる用語は、数当プローブがDNAフラグメン トから形成されるかRNAフラグメントから形成されるか に関係なく、又はクローン化フラグメント(DNAの場合) から精成されるか又は合成オリゴヌクレオチドから構成さ れるかに関係なく、該当プローブがゲノム又は転写RNA 分子中に通常存在するリポソームRNA遺伝子間のスペー サー領域に配置された配列とハイブリダイズすることを食 味する.

Neisseria gonorrhoeae # 2 0 H

するための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、

- 核酸グループ:

#### グループNCI1:

CGATO	CGTCG	TTATTCTACT	TCGC	NG I 1
GEGAA	GTAGA	ATAACGACGC	ATCG	NG[1]C
CCCVV	GUAGA	AUAACEACGC	AUCG	NGILICR
CGAUG	CCUCC	ANVARACA	uccc	NG118
グル-	- 7 HC I	2:		

グループHC12:
TTECTTTACE TACCECTTES CTASCTASCE SASC MEIZ
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA NC121C
GUDUGCUUAC UUAGDCAACG GCUAGGUAAA CGAA MG121CR
BUGGUUBACC UACCCSUBGA CUAAGUAAGC AAAC NGIZR
から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核
酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は
下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾
配列と同一のRNA又はDNA裏的とハイブリダイズする
という条件下で、

ー・夫々の末端のいずれかに1又は数値のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが産業さ

#### れているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を

Neisseria meningitidis### 出するための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、

## - 核酸グルーア: グループNKI1:

GGTCAAGTGT GACGT	ccccc	TC	NH   1
CAGGGCGACG TCACA	CTTGA	cc	3111NN
CAGGGGGACG BCACA	CUUGA	cc	NHITICR
CCUCAAGUCU GACGU	CECCC	បច	NNIIR
グループNM12:			
GTTCTTGGTC AAGTG	TGACG	τc	NH 12
GACETCACAC TIGAC	CAAGA	A C	NH121C
GACGUCACAC UUGAC	CAAGA	A.C.	NN[2]CR
CARCARCERC VVCRC	ncvcc	пс	N#128
グループNN13:			
GCGTTCGTTA TAGCT	ATCTA	CTGTGC	NN13
GCACAGTAGA TAGCT	SAATA	GAACGC	NN131C
GCACAGUAGA UAGCUA	DAAC	GAACGC	NM131CR

		<b>持表平5-50</b>	
CCGOUCCUUA BACCUAUCUA COGUGC	NHISR	から選択される核酸に算しており且つ15~	- 毒択された核
グルーアNHI4:		敵の最大数のヌクレオチドを含む配別、又は	i.
TECETTOGAT ATTECTATOT ACTETEDA	NR14	下記の場合のいずれにおいてもアローブが対	応する非体盤
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	NH I 4 I C	配列と同一のRNA又はDNA棚的とハイブ	リグイズする
DECACAGUAG AUAGCAAUAU CGAACGCA	NMI41CR	という条件下で、	
ACCEANCEVA VADECAVRCA VCAEACCV	NMI4R	- ・夫々の末端のいずれかに1又は数個のま	クレオテドが
グループ NH15:		付加もしくは除去されているか、	
TYTTETTCTFGGTCAAGTGTEACGTCGCCCTGAATGGATTC	TGTTCCATT	・首紀配列のいずれかで1個以上のヌクレオ	チドが置換さ
	NH IS	れているか、	
AATGGAACAGAATCCATTCAGGGCGAEGTCACACTTGACCA	AGAACAAA	· その両方により前記配列のいずれかと異な	る変異配列を
	NH151C	<b>★</b> む.	
A A U G G A A C A G A A U C C A U U C A G G C G A C G U C A C A C U U G A C C A	AGAACAAA	Branhamella catarrh	alis#£
	NHISICA	<b>教出するための本発明のハイブリダイゼーシ</b>	ョンアローブ
DUNBGUUCUDGGUCAAGUGUGACGUCGCCCBGAAUGGAUUC	U G U U C C A U V	iż.	
	NHISR	- 検敵グループ:	
グループNHI6:		グループBCI1:	
TTTGCCTAAC ATTCCGTTGA CTAGAACATC AGAC	<b>MMIB</b>	TTAAACATCT TACCAAAC	8011
GTCTGA7GTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA	MH181C	CTTTGGTAAG ATGTTTAA	BC111C
GUCUGAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA	NHIGICR	CUBUGGUAAG AUGDUUAA	BCILICA

MHIGR

TTGATGTTTA	AACTTGCTTG	G 3
TEEACCAAGE	AAGTTTAAAC	A T
DCCACCAAGC	AAGUUDAAAC	A U
UUCABCUUUA	AACUUGCUUG	C N
A / = 40 + 4		

グループ BC12:

という条件下で、

UUBGCCUAAC AUUCCGBBGA CUAGAACAUC AGAC

T G C A BCI2 TCAA BCI2IC UCAA BC121CR BCI2R DGGA から選択される核酸に無しており且つ15~選択された核 腹の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は 下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非常能 配列と同一のRNA又はDNA根的とハイブリダイズする

- ・夫々の末端のいずれかに1又は数億のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、
- ・剪記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが重換さ れているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を

<u>Haemophilus</u> <u>ducreyi</u>株を検出する ための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、 - 核酸グループ:

グループHBI1:

TTATTATGCG	CGAGGCATAT	TC	# D 1 1
CAATATECCT	CGCCCATAAT	A A	HDJ11C
CAAUAUGCCU	CCCCCAUAAU	AA	BDILICR
DUAUUAUGCG	CCAGGCAUAU	u <b>c</b>	8 D I 1 R

UBAAACAUCU BACCAAAG

酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は 下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾 配列と同一のRNA又はDNA集的とハイブリダイズする という乗件下で、

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核

- ・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、
- 前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが電換さ れているか、
- ・その両方により前紀配列のいずれかと異なる変異配列を 含む.

Haemophilus influenzae#### 出するための本発明のハイブリダイゼーションアローブは、 - 核酸グルーア:

グルーア8111:

ACGCATCANA TIGACCGCAC IT

HIII

BCIIR

# 特表平5-504889 (21)

AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT	HIJIIC	77 50 F G るための本発明のハイブリダイゼーシ	ョンプローブは、
ANGUGEGGUE ANUUUGAUGE GU	HJILICR	- 核酸グループ:	
ACCCAUCAAA BUGACCGCAC UB	HIIIR	グループ BPI1:	
グループHI12:		CCACACCCAT CETETGGACA GGETT	8 P f 1
ACTTIGAAGT GAAAACTTAA AG	\$11Z	AAGCCTETCC AGAGGATGGG TGTGG	BPIIIC
CTTTAACTTT TCACTTCAAA GT	B1151C	VARCCARICC VEVERNAGE DEREC	8P111CR
CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GO	#1121CR	CCACACCCAU CCUCUGGACA GGCUU	8P ( 1 R
ACUBUGAAGU GAAAACUDAA AC	8 [ [ 2 R	から選択される稼骸に属しており且つ!	しち~選択された核
から選択される核酸に属して	おり且つ15~載択された枝	皺の最大数のメクレオチドを含む配列、	又往
酸の最大数のヌクレオチドを	合む配列、又は	下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾	
下記の場合のいずれにおいて	もプローブが対応する非体的	配列と同一のRNA又はDNA額的とノ	ハイブリゲイズする
配列と同一のRNA又はDN	A振的とハイブリディズする	という条件下で、	
という条件下で、		- ・矢々の末端のいずれかに1又は数値	!のヌクレオチドが
- ・夫々の末端のいずれかに	1 又は数額のヌクレオチドが	付加もしくは除去されているか、	
付加もしくは除去されている:	か、	・前記配列のいずれかで1番以上のヌク	レオチドが置換さ
・前記配列のいずれかで1個!	以上のヌクレオチドが置換さ	れているか、	
れているか、		・その何方により前記配列のいずれかと	異なる変異配列を
・その両方により前記配列の(	いずれかと異なる変異配列を	<b>숨 t</b> .	
含む,		Streptococcus pne	umon la e #
Bordetella p	e r t u s s i s 株を検出す	そ検出するための本発明のハイブリダイ	ゼーションプロー
	,		
プは、		記列と同一のRNA又はDNA側的とハ	イブリゲイズする
- 核酸グループ:		という条件下で、	
グループSP11:		- ・失々の宋雄のいずれかに1又は数個	のヌクレオチドが
CTCAGAGATC ACCAAGTAAT CCA	SP11	竹加もしくは除去されているか、	
TGCATTACTY GGTGATCTCT CAC	SP311C	・前記配列のいずれかで1個以上のヌク	レオチドが置換さ
BECADDACUU GEDEAUCUCU CAC	SPILICR	れているか、	
GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA	3 P ( 1 R	・その両方により前記配所のいずれかと	異なる変異配列を
1 N - 7 SP12:		<b>ቴ</b> િ.	
AGGAACTGCG CATTGGTCTT	SP 1 2	Streptococcus aga	lactiae#
AAGACCAATG CGCAGTTCCT	SPIZIC	を検出するための本発明のハイブリダイ	ゼーションプロー
AACACCAAUG CGCAGBUCCU	SPIZICR	プは、	
AGCANCUGCG CAUUGGUCUU	SPIZR	・ - 核酸グループ:	
グループSP13:		グループSAII:	
GAGTTTATGA CTGAAAGCTC AGAA	SP [ 3	AATCGAAAGG TTCAARTTGT T	SAII
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC	\$P191C	AACAATTTGA ACCTTTCGAT T	SAILIC
ADCACUCA ACACOCADVA VCAC	SPIBICR	WACWARACE WEER WACKWAR	SAILICR
CAGUUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA	SP13R	ARUCGAAAGG UUCAAAUUGU U	SAIIR

グループSA12:

GGAAACETGC CATTTGCGTC TT

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC

SAIZ

SAIZIC

から選択される核酸に貫しており且つ15~選択された核

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非体節

酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

AAGACGCAAA UGGCAGGUUV	cc	SAISICA
ECNANCENCE CARRACERE	ข ง	SAIZR
グループSA13:		
TCCACGATCT AGAAATAGAT	TGTAGAA	SAI3
TTCTACAATC TATTTCTAGA	TCGTGGA	SAIBIC
RACDVCVVAC AVORACAVEV	BCCGCCA	SAISICR
UCCACGAUCU AGAAABAGAU	UGUACAA	SAIBR
グループSAI4:		
TCTAGTTTTA AAGAAACTAG	STT	SAI4
AACCTAGTTT CTTTAAAACT	ACA	SAT41C
AACCUAGUUU CUUUAAAACU	AGA	SAI41CR
UCUAGUUUA AAGAAACUAG	cuv	SAI4R
から選択される核酸に属	しており且つ15~選(	欠された核
酸の最大数のヌクレオチ	ドを含む配券、又は	
下記の場合のいずれにお	いてもプローブが対応。	する非任動

- ・夫々の末端のいずれかに1又は數個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか

配列と同一のRNA又はDNA供的とハイブリダイズする

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置接さ

れているか、

・その何方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 合む。

本先明は更に、適切な条件でアローブが Campylobacter jeluni 及び Campylobacter coli 由来の DNA 及び/又はRNA と特異的にハイブリダイズするという条件下で、図10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から誘導される15~最大数のヌクレオチドの配列、又は下がUで置接された対応配列、又はその相補配列、又は下がUで置接された対応する相補配列を含む Campylobacter jejuni及び Campylobacter coli 株を検出するためのハイブリダイゼーションプローブに係る。

グループNGI1、NGI2、NMI1、NMI2、NMI3、NMI4、NMI5、NMI6、BCI1、BCI2、HDI1、HIII、HII2、BPI1、SPI1、SPI1、SPI3、SAI2、SAI3及びSAI4に示した配列中、アルファベットは以下のヌクレオチドを表す。

A:アデニル残姦

C:シチジル残落

という条件下で、

G:グアニジル残葛

T:ナミジル残葛

ひ:ウラシル残器。

「棚的」なる用語は、上記に定義したグループNGI1. NGI2、NMI1、NMI2、NMI3、NMI4、NMI5、NMI6、BCI1、BCI2、HDI1、HII1、HII1、HII2、BPI1、SPI2、SPI3、SAI1、SAI2、SAI3及びSAI4の配列のいずれかに相補的な配列を意味する。

本免明のプローブが上記配列の片側又は質優に核酸な兵部(例えばクローニングベクターの核酸フラグメント又ははなクローニングベクターから前記プローブを切断することにより得られるリンカーフラグメント)を含む場合、ことにより得られるリンカーフラグメント)を含む場合、このような販長部は、遠って定義するような本発明の方法によりは改きされる機能を表現されるである。このようなハイブリダイゼーションは否生性であり、プローブの特異性を低下させる。好達プローブは、上記グループの配列のいずれかから形成される

核酸フラグメントから構成され、譲フラグメントは15〜 該当核酸配列の最大敷のヌクレオチドを含む。

上記メクレオチド配列(及び以下に記載する他の配列) において、式の左端は常に貧当配列の5°末端に対応し、 右端は3°末端に対応する。

更に「グルーアXのアローブ」 (XはNGII, NGI 2, NMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5, NMI6, BCI1, BCI2, HDI1, HII1, HII2, BPI1, SPI2, SPI3, SAI1, SAI2, SAI3及USAI4から選択される) と称するとき、このようなアローブは上紀又は下紀に定義するグループに属する検数の1種に含まれる配列を有するものと理解されたい。

また、本明組書中で使用する「ヌクレオチド」なる用語は、特に明記しない限りリボヌクレオチド及びデオキシヌクレオチド及び修飾ヌクレオチド(例えばイノシン)を無差別に意味するものと理解されたい。「ヌクレオチド」なる用語は更に、修飾基(例えばハイブリダイゼーション能に複本的に影響しない化学的修飾基)を含むヌクレオチドも包含する。このような修飾基の目的は、例えば特に該当

特表平5-504889 (23)

RNA又はDNA類(例えば他のDNA及び/又はRNA と共に生物学的サンプル中に最初に含まれているRNA又 はDNA額)とのハイブリダイゼーション産物中から課業 又はラベルされたプローブを接で検出するために適切なマ ーカー又はラベルと医療又は関係的に結合し易くすること である。

例えば、このような修飾器は、適切な酵常又は蛍光又は 化学発光ラベルを担持する他の拡体により特異的に認識され得る技体により認識可能である。可能な暴騰手順につい ては送って詳細に説明する。

本発明は更に、上記配列のいずれかを有しており且つ上記プローブの特異性を変更しないように一部のメクレオチドが置換したプローブにも係る。プローブは、上記グループのいずれかに属する核酸の1種又はその一部から構成される場合もあるが、その場合、プローブはNelsseria meningitidia, Braghamella catarrhalis, Haemophilus ducrevi, Haemophilus lufluegzae, Bordetella pertussis, Strep

ngitidis. Branhameija catar
rhalis. Haemophijus ducreyi.
Haemophilus influenzae. Bor
deteija pertussis. Streptoc
occus agaiactiae. Streptoco
ccus pneumonjaeiliki Campylo
bacter jejunj及びCampylobact
er collo天然RNA又はDNAに含まれる配列に
相補的な配列(数字のみ又は数字の後にRを記述すること
により表す)から形成されるアローブを提供する。

tococcus agalactiae. Strept
ococcus pneumoniae又はCampyi
obacter jejuni及びCampyiobac
ter coli株の遺伝材料に対する該プローブとの特異性を変えない程度までその関係にメクレオチド延長部を含む。

従って本見明は、場合によりヌクレオチド配列に少数の 些少の変異を有するほとんどのNeisseria so norrhoeae. Neisseria mening itldis. Branhamella catarrh alis. Haemophilus ducrevi. H aemophilus influenzae. Bord ctella pertussis. Streptoco Ccus agalactiae. Streptococ Cus pneumoniae6しくはCampylob acter jejuni及びCampylobacte E colioRNAXはDNAに含まれる配列のヌクレ オチド配列からなるレアリカ(数字の後にICXはICR と記述することにより表す)、又はNeisseria meni

より詳細には、該当DNA中の個的配列は、このような個的に対する本発明のプローブのハイブリダイゼーション特異性に影響しないように、場合により株間に些少な天然の変異を有するNeisseria gonorrhoe ae, Neisseria meningitldig.
Branhamella catarrhalis, Haemophilus ducreyl, Haemophilus ducreyl, Haemophilus influenzae, Bordeteila pertuggis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pheumoniae又はCampylobacter ieluni及びCampylobacter coli株の金都ではないとしても大都分に存在する以下の連載配列のいずれかから構成される。

Neisseria gonorrhoeseの場合、 GCGAAGTAGA ATAACCACCC ATCG CITTGCITAC TIAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA。

Neisseria meningitidisの場合. CAGGGGGGACG TCAGACTTGA CC GACGTGACAC TTGACCAAGA AC

特表平5-504889 (24)

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC
TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA
AATGGAACAGAATCCATTCAGGGCGACGTCACACTTGACCAGAACAAAA
GTCTGATCTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA.

<u>Branhamella satarrhalisの場</u>

CTTTGGTAAG ATGTTTAA

TECNECANCE ANGITTANAC ATCAN.

Haemophi)us ducreviの場合. CAATATGCCT CGCGCATAAT AA.

<u>Bordetella pertussis</u>の場合、 AACCCTCTCC ACACCATCGC TCTCC.

Haemophilus influenzaeの場合、
AACTCCGCTC AATTTGATGC CT
CTTTAAGTTT TCACTTCAAA CT.

Streptococcus pneumoniaeの 場合、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC
AAGACCAATG CGCAGTTCCT
TTCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC.

ococcus pneumoniae XはCampylobac
ter jejuni及びCampylobac
ter coli 株を検出するための方法にも係り、該方
法は、必要に応じて適切な変性条件下で核酸(DNA又は
RNA)をハイブリゲイゼーションできるようにしておい
た約記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在
し得る株の相補的核酸との間のハイブリゲイゼーションを
可能にする条件下で本発明のプローブと接触させる段階と
ハイブリッドが形成された場合にはこれを検出する段階と
を会な。

本発明の方法は、該当生物を探査するサンアル中に存在する可能性のある酵母、真面、原生動物、他の細菌枠及び/又はヒト制動から、Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitid is. Branhamella catarrhalis. Haemophilus ducrevi, Haemophilus influenzae, Bordetell a pertussis, Streptococcus gagalactiae, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter j

Streptococcus agaiactineの

AACAATITGA ACCTTTCCAT T

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC

TTETACAATE TATTTCTAGA TEGTGGA

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA.

本売明のアローブは、対応するヌクレオチド配列を含むインサートを含む組織プラスミドをクローニングし、必要に応じて適切なヌクレアーゼを使用してクローン化プラスミドから対応するヌクレアーゼ配列を切断し、例えば分子量に促う分面により回収することにより形成され得る。本発明のアローブは、例えば従来のホスホートリエステル法により化学的に含成することもできる。

本発明は更に、生物学的サンアル中でNeisseria me ningitidis, Branhametia cat arrhalis, Haemophilus ducre yi. Haemophilus influenzae. Bordetella pertussis. Streptococcus agalactiae, Strept

ejuni及びCampylobacter coliを、
区別することができる。本発明の方法は、Neisser
ia gonorrhoeae、Neisseria m
eningitidis、Branhamella ca
tarrhalis、Haemophilus ducr
eyi、Haemophilus influenzae。
Bordetella pertussis、Strep
tococcus agalactiae、Strept
ococcus pneumoniae又はCampyl
obacter jeluni及びCampylobac
ter coli稼むサンアル中で収録又は株を培養後に
微出する方法に係る。

ハイブリッドが検出された場合、グルーアNGI1、NGI2、NMI1、NMI2、NMI3、NMI4、NMI5、NMI6、BCI1、BCI2、HDI1、HII
1、HII2、BPI1、SPI1、SPI2、SPI3、SAI1、SAI2、SAI3及びSAI4のプローブのいずれかの使用中に夫々Neisseria meningiti

特表平5~504889 (26)

s. Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordete
lla pertussis, Streptococcu
s agalactlae及びStreptococcu
s pneumoniaeによる悪衆が生物学的サンアル
中に存在していたと判断することができる。

本売明の有利な実施な機によると、Neisseria men ingitidis。Branhamella cata rrhalls。Hacmophilus ducrey l. Haemophilus influenzae。Bordetella pertussia。Strept ococcus agalactiae。Strept ococcus agalactiae。Strept ococcus pneumoniaeXはCampylobacter Jeluni及びCampylobacter coli株を検出するための方法において、使用されるアローブは、生物学的サンアル中に存在し得るNeisseria meningitidis。Branhamella catarrhalis。Haemophilus

7.1.20%酸イオン化ホルムアミド、0.02%F1 coll、0.02%ウシ血液アルプミン、0.02%ポ リビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの質断要性サケ線チDNAを含する。

好適洗浄媒体は、約3×SSC、25mMリン酸緩衡液 pH7.1及び20%脱イオンホルムアミドを含有する。 他のハイブリダイゼーション又は洗浄媒体も使用できる。

しかしながら、アローブ又は無体に変更を導入する場合、必要な特異性を得るためにアローブを使用可能な温度は、B.D.HAMES and S.J.HIGGINS, (eds.)。 Nuciteic acid hybridization. A practical approach. IRL Press. Oxford, U.K., 1985に記載されているような数知の関係に応じて変更すべきである。

この点では、一般にDNA:DNAハイブリッドはRN A:DNA又はRNA:RNAハイブリッドよりも安定性 が低いことにも智慧すべきである。従って、検出すべきハ イブリッドの性質に依存して、特異的検出を実施できるよ うにハイブリゲイゼーション条件を選応させるべきである。 ducreyi, Haemophilus influenzae, Bordetella pertussia.
Streptococcus asalactise, Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter Jejuni及びCampylobacter coli#のDNA全体及びRNAとハイブリダイズするアローブである。

ハイブリダイゼーション条件は、例えばハイブリダイゼーション温度、媒体の成分の性質及び過度、並びに形成されるハイブリッドの洗浄温度等の数幅のパラメーターに依存して数視され得る。

ハイブリダイゼーション及び洗浄温度はアローブ(その核酸組成、種類及び長さ)に応じて上限を制限され、本発明のアローブの最高ハイブリダイゼーション又は洗浄温度は約30~58℃である。温度がこれ以上になると、デュアレクシングはアローブと額的との間に形成されるハイブリッドの無難(又は変性)に銀合する。

好道ハイブリダイゼーション媒体は約3×SSC(1×SSC=0.15M NaCl.0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩黄液pH

本見明に従って、一般にNelsseria gono
rrhoeae, Nelsseria meninglt
ldis, Branhamella catarrhal
ls. Haemophilus ducrevi. Hae
mophilus influenzae, Bordet
ella pertusais, Streptococcu
a pasumoniae又はCampylobacte
r jelunl及びCampylobacte
r jelunl及びCampylobacte
r jelunl及びCampylobacte
r jegnoconiae又はCampylobacte
r jegnoconiae又はCampylobacte
r jegnoconiae又はCampylobacte
r jegnoconiae又はCampylobacte
r jegnolyconiae
r je

本見明の別の実施思微によると、ハイブリダイゼーション ン温度を必ずしもハイブリダイゼーションが特異的となる ような値に質節する必要はなく、特に、ハイブリダイゼー ションが特異的となるような値に対応する温度で洗浄を実 施するのであるならば、ハイブリダイゼーションが特異的 となるような温度よりも低い温度でハイブリダイゼーション ンを行ってもよい。

持表平5-504889 (26)

グルーアNGIIのアローブでNeisseria <u>s</u>
onorrhoese株を検出(及び他の額面分類群から 区別)するための方法の実施感機によると、ハイブリダイ ゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に関節すると違 切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNGI2のプローブでNcisserie 及 onorrhoese</u>株を検出(及び他の細菌分類群から 区別)するための方法の実施態機によると、ハイブリダイ ゼーション及び/又は洗浄温度は約50℃に調節すると激 切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループ N M I 1 の プローブで N c 1 s s c T 1 a 皿 e n i n x i t 1 d l s 株 を 検出 ( 及び他の 細菌分類 群から区別 ) するための方法の実施思想によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45 でに飼節すると 遺切であり、媒体は上記に定義した関である。

グループBCIIのプローブでBranhamella
catarrhalis株を検出(及び他の報慮分類群から区割)するための方法の実施な機によると、ハイブリ
ダイゼーション及び/又は洗浄温度は約30℃に調節する
と適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グルーアBC I 2のアローブで Branhame | 1 | e catarrhalis 株を検出(及び他の組御分類群から区別) するための方法の実施整礎によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約42℃に調節すると重切であり、鉱体は上配に定義した葉である。

グループ 8 P I 1 のプローブで B o r d e t e 1 l a.

p e r t u s s i s 体を 検出 ( 及び他の報節分類群から区別) するための方法の実施態機によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約5 5 ℃に製節すると重切であり、媒体は上記に定義した原である。

グルーアHD11のアローブで<u>日 e e m o p h i l u s</u>
d u c r e y i 株を検出(及び他の超端分類群から区別)
するための方法の実施整徴によると、ハイブリダイゼーショ
ン及び/又は洗浄温度は約40℃に関節すると適切であり、 媒体は上記に定義した類である。 グループ N M I 3 の アローブで N c i s s c r i a m e n i n g i t i d i s 姓を検出 ( 及び他の細密分類 算から区別 ) するための方法の実施思復によると、ハイブリダイゼーション及び / 又は洗浄温度は約40 でに質節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループNM14のプローブでNeinserla meninglatidis 株を検出(及び他の郷電分類群から区別)するための方法の実施思想によると、ハイブリグイゼーション及び/又は洗浄温度は約48でに質節すると遊切であり、媒体は上記に定義した類である。

グルーア N M I 6 の アローブで N c 1 8 8 6 F 1 8 m e n 1 n g 1 t l d 1 s 教を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施無機によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約50 でに質節すると連切であり、媒体は上配に定義した類である。

グループHI!1のプローブで<u>Haemophilus</u>
<u>Influenzae</u>株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施態機によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約55℃に関節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループHII2のプローブで<u>Haemophilus</u>
<u>influcnzae</u>株を検出(及び他の船歯分類群か ち区別)するための方法の実施駆使によると、ハイブリダ イゼーション及び/又は洗浄温度は約35でに関節すると 適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループSAIIのプローブで<u>Streptacocc</u>

<u>us agalactise</u>株を検出(及び他の帰腹分類 群から区別)するための方法の実施整礎によると、ハイブ リダイゼーション及び/又は洗浄温度は約35℃に調節す ると適切であり、媒体は上配に定義した類である。

グループSAI2のアローブで<u>Streptococc</u>

<u>US A R B I B C t I B C</u> 株を検出(及び他の細菌分類

群から区別)するための方法の実施思機によると、ハイブ
リダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に質節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

 **待表平5-504889 (27)** 

グループSAI3のプローブで<u>Streptococc</u>

<u>U.S. ERAIACtiae</u>株を検出(及び他の細菌分類群から区別)するための方法の実施駆機によると、ハイブリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約45℃に質節すると適切であり、媒体は上記に定義した類である。

グループ S A I 4 のプローブで S t r e p t o c o c c c u 2 2 2 3 2 1 2 c t 1 3 c 性を 検出 ( 及び他の報告分類 群から 区別 ) するための方法の実施型機によると、ハイプリダイゼーション及び/又は洗浄温度は約37でに調節すると達切であり、媒体は上記に定義した気である。

グループSPI2のプローブで<u>Streptococc</u>

<u>US Pneumoniae</u> 供き検出(及び他の細胞分類
群から区別)するための方法の実施整徴によると、ハイブリグイゼーション及び/又は洗浄温度は約45でに質節すると適切であり、媒体は上記に定義した原である。

- <u>Neisseria gonorrhoeae</u>に特異的なプローブ、即ちグループNGII又はNGI2のプローブと、
- これらのプローブと Netseerta <u>gonorr</u> <u>hoeae</u>様の DNA 及び/又はRNA のみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液 又は該緩養液を生成するために必要な成分と、
- ー 群紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に<u>Branhamelia</u> <u>catarrh</u> <u>alia</u>株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記<u>Branhamella catarrhalis</u> に特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、
  のちグルーアBCI1又はBCI2のアローブと、
- ーこれらのプローブと Branhamella cata rrhall B 株の D N A 及び / 又は R N A のみとの間に ハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な観 毎 棟 又は該報報限を生成するために必要な成分と、

グループSPI3のアローブで<u>Streptococc</u>

<u>U.s. P. D. S. U. T. O. D. L. S. C.</u> 株を検出(及び他の都置分類
群から区別)するための方法の実施程機によると、ハイブ
リゲイゼーション及び/又は洗浄温度は約45でに質節すると適切であり、媒体は上記に定義した版である。

本売明は更に<u>Neisseria</u> <u>meningit</u> <u>dis</u>株を特異的に検出するためのキットに係り、鉄キットは、

- Neisseria meningitidia に特異的なプローブ、即ちグルーアNMI1, NMI2, NMI3, NMI4, NMI5又はNMI6のプローブと、
- ーこれらのアローブと<u>NelsBeria</u> <u>mening</u> <u>itidis</u>株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハ イブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩鬱 液又は該緩情格を生成するために必要な成分と
- ・一算記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時後出するための手段とを含む。

本現明は更に<u>Neisseria gonorrhoe</u> <u>se</u>株を特異的に検出するためのキットに係り、質キット は、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを選時検出するための手段とを含む、

本発明は更に<u>Haemophilus</u> <u>ducreyi</u> 株を特異的に被出するためのキットに係り、該キットは、 -上配<u>Haemophilus</u> <u>ducreyi</u>に特異的 なプローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即 ちグループHDI1のプローブと

- これらのアローブと Haemophilus ducr <u>syl</u>年の DNA 及び/又はRNA のみとの間にハイブリ ダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩雪液又は 蘇維衡液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。...

本発明は更に<u>Bordetella</u> <u>Pertussi</u>

<u>a</u>株を特異的に検出するためのキットに係り、数キットは、
-上記<u>Bordetella</u> <u>Pertussis</u>に特異

的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、

即ちグループBPI1のアローブと、

- これらのプローブと<u>Bordetella pertu</u> <u>s s i s</u>様のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブ

特表平5~504889 (28)

リダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝 核又 は鎮緩素液を生成するために必要な成分と.

- 詳記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時後出するための手段とを含む。

本発明は更に<u>Haemophllus influen</u> <u>Sae</u>株を特異的に検出するためのキットに係り、数キットは、

- 上記 Haemophilus influen 2aeに 特異的なアローブから意訳された少なくとも1種のアロー ブ、即ちグループHII1又はHII2のアローブと、

ーこれらのアローブと<u>Haemophilus</u> <u>influencence</u>株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な報告 被又は該級債務を生成するために必要な成分と、

~前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。

本発明は更に<u>Streptococcus agala</u> <u>ctiae</u>株を特異的に検出するためのキットに係り、該 キットは、

- ERStreptococcus agalactia

c. に特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブ、即ちグルーアSAI1, SAI2, SAI3又はSAI4のアローブと、

- これらのプローブと<u>Streptococcus</u> <u>& E Blactiae</u>株のDNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な 被貨液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本売明は更に<u>Streptococcus pneumonlae</u>株を特異的に検出するためのキットに係り、該キットは、

- 上記<u>Streptococcus Pneumonia</u> sc特異的なアローブから選択された少なくとも1種のプローブ、即ちグループSPI1. SPI2又はSPI3の プローブと、

- これらのアローブと <u>Streptococcus</u> <u>PReumoniae</u>株の DNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は棘緩衝液を生成するために必要な成分と、

一載記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本見明は更に<u>Campylobacter</u> <u>jejun</u> <u>1</u>及び<u>Campylobacter</u> <u>coli</u>様を特異的 に検出するためのキットに係り、数キットは、

- 上記<u>Campylobacter</u> <u>jejuni</u>及び<u>Campylobacter</u> <u>coli</u>に特異的なアローブから選択された少なくとも1種のアローブと、

- これらのアローブと Campylobacter je junj 及び Campylobacter coll 株の DNA及び/又はRNAのみとの間にハイブリグイゼーショ ン反応を生じさせることが可能な緩慢被又は該緩衝液を生 成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明のプローブは、核酸プローブを利用するアッセイの特異性を増加するサンドイッチハイブリダイゼーションシステムで使用することができる。核酸プローブに基づくアッセイにおけるサンドイッチハイブリダイゼーションの原理及び使用は既に記載されている(例えばDUNN a

nd HASSEL. Cell. 12: 23-36
: 1977: RANKI et al., Gene.
21: 77-85: 1983)。 直接ハイブリダイ
ゼーションアッセイは好ましい速度を有するが、サンドイッ
ナハイブリダイゼーションは信号対策音比が高いという点
で有利である。更に、サンドイッチハイブリダイゼーションは核酸プローブに基づくアッセイの特異性を増加することができる。

返正に設計するならば、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイは実際に、同一生物の2種の異なる核散部分を認識する2種のプローブを使用する場合、核散アローブに高づく試験の特異性を最大にすることができる。 滑足しなければならない唯一の実件は、2種のプローブの両方が(i) 概的生物の同一核散分子にハイブリダイズし、且つ(ii)同一の非額的生物にハイブリダイズしないことである。

2種の所与のアローブI及びIIを使用する場合、サンドイッチハイブリダイゼーションシステムは次のように設明することができる。

プロープIは生物(Cでなく)A及びB由来の核酸とハ

イブリダイズする。

プローブ【【は生物(Bでなく) A 及び C 由来の検散と ハイブリダイズする。

両方のプローブが集的核酸にハイブリダイズすることが 絶対的に必要であるので、生物人由来の核酸がサンプル中 に存在する場合のみに検出可能なシグナルが発生される。 プローブの一方が検出すべき生物に特異的である場合には、 他方のプローブは第1のプローブよりも同一個的分子にハ イブリダイズするのであれば、特異的配列から構成しても 非特異的配列から構成してもよい。

本見明のプローアは、同一概的分子にハイブリダイズする別の非特異的又は特異的プローアと失々能み合わせてNeisseria gonorrhoeae Neisseria meningitidis, Branhame ila catarrhalis, Haemophilus influenzae, Bordetella pertuggis. Streptococcus agalactiae. Streptococcus pneumoniae又はCampylobacter leluni&UCamp

るためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用 キットに係り、放キットは、

- 同一核酸分子を輝的にし且つ少なくとも1種が<u>Neis</u> <u>seris</u> <u>meningitidis</u>に対して特異的で ある少なくとも2種のプローブと、

- これらのプローブと Neisseria mening jtidis 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブ リダイゼーション反応を生じさせることが可能な報告液又 は該価格液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンアル中でBranhamel jacatarrhalla辞をin yitro検出 するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ 用キットに係り、数キットは、

- 岡一核酸分子を稼的にし且つ少なくとも1種が<u>Bran</u> <u>hamella</u> <u>catarrhalls</u>に対して特異的 である少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと <u>Branhamella</u> <u>cata</u> <u>rrhalls</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイ 持表平5-504889 (29)

 vlobacter
 colictapphotomyren

 イブリダイゼーションアッセイで使用することができる。

 サンドイッチハイブリダイゼーションアロセスでは、駅的

 DNA又はRNAを保安する生物率的サンブルにアローブを同時に加えてもよいし、別々に加えてもよい。

本見明は更に生物学的サンアル中でNeisseria sonorrhoese株をin vitro検出する ためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キッ トに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を繋的にし且つ少なくとも1種がNeis seria gonorrhosasに対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのアローブとNeisseris RonoTr hoess体のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリ グイゼーション反応を生じさせることが可能な観音液又は 該緩緩液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で<u>Neisseria</u> meningitidis株をin <u>vitro</u>機出す

ブリダイゼーション 反応を生じさせることが可能な緩壊液 又は該緩慢液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンブル中で<u>Haemophil</u> <u>us ducrevi</u>株を<u>in</u> <u>vitro</u>検出するため のサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キット に係り、該キットは、

- 同一核酸分子を認めにし且つ少なくとも1種が<u>Haemophilus ducrevi</u>に対して特異的である少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのアローブと Haemophilus はucrey i 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な観響核又は鉄板 毎節を生成するために必要な成分と、

- 育紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを海時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンアル中で<u>Haemophil</u> us <u>influenzae</u>株を<u>in</u> <u>yitro</u>後出す るためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用

特表平5-504889 (30)

キットに係り、鉄キットは、

- これらのアローブと<u>Haemophilus</u> <u>in()</u> <u>Uenaae</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブ リダイゼーション反応を生じさせることが可能な報告液又 は該解権済を与軟するために必要な成分と

ー前記ハイプリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で<u>Bordetell</u>

<u>a pertussis</u>株を<u>in vitro</u>検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を額的にし且つ少なくとも1種が<u>Bord</u> <u>etella</u> <u>pertussis</u>に対して特異的である 少なくとも2種のアローブと、

- これらのプローブと Bordetelle <u>Perty</u> <u>s s l s</u>株の D N A 及び/又は R N A との間にハイブリダ イゼーション反応を生じさせることが可能な観音液又は鉄 縦筒液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運時検出するための手段とを含む。

本見明は更に生物学的サンアル中で<u>Streptoco</u>
<u>ccus</u> <u>agalactiae</u> 株を<u>in</u> <u>vitro</u> 依 出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセ イ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を無的にし且つ少なくとも1種が<u>Stre</u> <u>Ptococcus</u> <u>agalactise</u>に対して特異 的である少なくとも2種のアローブと、

ーこれらのプローブと Streptococcus A R & lactise 株のDNA及び/又はRNAとの間にハ イブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な破壊 液又は棘線衝滅を牛或するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンアル中で<u>Streptoco</u>
<a href="mailto:screentoco">scus pneumoniae 株をjn vitro検</a>
出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセ
イ用キットに係り、該キットは、

一周一核酸分子を振的にし且つ少なくとも1種が<u>Stre</u> <u>Ptococcus</u> <u>Pneumonfae</u>に対して特異 的である少なくとも2種のアローブと、

ーこれらのアローブと Streptococcus pneumoniae 株の DNA 及び/又はRNA との間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な破害彼又は該種債液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンアル中で<u>Campyloba</u>
<u>cter</u> <u>jejuni</u>株を<u>in</u> <u>vitro</u>検出するためのサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに係り、該キットは、

- 同一核酸分子を稼的にし且つ少なくとも1種が<u>Campylobacter</u> <u>jejuni</u>に対して特異的である 少なくとも2種のアローブと、

- これらのアローブと Campy lobacter je juni 作のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダ イゼーション反応を生じさせることが可能な報情液又は数 緩慢液を生成するために必要な成分と、 一朝記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。

本発明は更に生物学的サンプル中で<u>Camp:yloba</u>
<u>cter coll</u>株を<u>in vitro</u>検出するための
サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイ用キットに
傷り、粒キットは

- 同一核酸分子を額的にし且つ少なくとも1種が<u>Camp</u> <u>ylobacter</u> <u>coli</u>に対して特異的である少な くとも2種のアローブと、

ーこれらのアローブと Campy lobacter Co 「1 棒のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼ ーション反応を生じさせることが可能な難考徴又は該被考 液を生成するために必要な成分と、

- 訂記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを被略体化するための手段とを含む。

本発明のプローブは、コンペティションハイブリダイゼ ーションプロトコルでも使用することができる。

コンペティションハイブリダイゼーションでは、集的分子は特異的アローブとその補体との間に形成されるハイブ リッドに観合する。個的数が多ければ多いほどプローブと

特表平5-504889 **(31)** は確々のレベルに調節することができる。

増額法又は検出法又はその両方は特質的であり得る。両方が特異的な場合は特異性が最大になるので舒適である。このようなPCRを利用する高特異性試験は本発明のプローブを使用して実施され得る。

しかしながら、場合によっては、多様な生物に使用できるように増幅法を標準化するために、特異的被出に結び付けられた本発明の検出プローブを突叉する保存性プライマーを使用する非特異的増幅法が有利である。

要準化増幅法で使用される増幅プライマーは、スペーサー領域の両値の16S及び23SrRNA遺伝子の保存領域に見いだされる(実施例1参照)。

本売明は更に、検出すべき散生物に特異的な本売明のアローブのいずれかを使用して生物学的サンプルに含まれる1種の散生物又は散種の散生物を同時に<u>in vitro</u>検出するための方法にも係り、該方法によると、好ましくはプローブ領域を突叉する少なくとも1組のアライマーによる弊来的増額を使用して、生物学的サンプル中に存在する(概約配列を含む)DNA及び/又はRNAを複数し、増幅した概的配列と要上のプローブとの特異的ハイブリダ

その補体との間に形成されるハイブリッドの量は少なくなる。特異的部的が存在していたことを示す陽性シクナルは、 無的を加えなかったシステムに比較してハイブリダイゼー ション反応が低いことにより確認される。特定の実施型像 によると、適切に無難した特異的オリゴヌクレオチドを固定した。 要器(例えばマイクロタイター皿のウェル)に移し、ハイブリダイゼーションを続ける。洗浄後、相補的オリゴヌクレオチドとの間に形成されたハイブリッドを クレオチドとプローブとの間に形成されたハイブタット 使用したラベルに応じて好ましくは定量的に調査する。

本売明のオリゴヌクレオチドは、静葉的に増幅した特異的フラグメントを生成するためにポリメラーゼ酸反応技術(PCR: Mullis and Faloona, Methods in Enzymology 155:335-350. 1987)で増幅アライマーとして及び/又は交叉オリゴヌクレオチドアライマー間で増幅されたフラグメントを検出するためのアローブとして使用することができる。

PCRによるハイブリデイゼーションアッセイの特異性

イゼーションを可能にする媒体中で、1 階以上のオリゴヌ クレオチドプローブを取知の位置にドットスポットした膜 に前記生物学的サンプルを接触させ、ハイブリダイゼーショ ンにより形成されたハイブリッドを適切な手段により検出 する。

増額が必要な場合、その目的は個的配列を増幅し(それによって最的配列の交叉領域も増幅させ)、増幅領域のみを課題することである。

生物学的サンプル中に十分な額的配列が存在する場合。 増幅は不要である。

このような場合、ハイブリデイゼーション前に例えば化学的手段により又は特異的染料の抵加により保護を実施すべきであり、生物学的サンブル中に存在するDNA及び/又はRNA全体を保護することに智恵すべきである。

本発明は更に、生物学的サンプル中に含まれる1種の微生物又は散程の数生物を同時に<u>1.11 vitro</u>検出するためのキットに係り、該キットは、

- 検出すべき報生物に特異的であり、膜にドットスポット した本発明のプローブの少なくとも1種と

- 該プローブの集的配列を含む D N A 及び/又はRNAの

酵素的増額を適時実施するために必要なブライマーと、

一 酵素的増額が可能であり及び/又はこれらのプロープと 検出すべき数生物のDNA及び/又はRNAとの間にハイ ブリデイゼーション反応を生じさせることが可能な緩鬱液 又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。

上記方法及びキットは、Saikl et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6230-6234. 1989)により記載されている 逆ドットブロットアッセイのような逆ハイブリダイゼーションドットブロットアッセイを会な。

この場合、5 ビオチニル化アライマーを用いるPCRを使用して振的配列をまず酵素的に増傷する。第2段階では、固体支持体に固定した特異的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション後、増幅産物を検出する。この方法は実施例2に記載する変形方法のような数種の変形が考えられる。例えば、この方法はスペーサー領域を変叉する登画的アライマーを用いるPCR、及び該当生物の程々の特異的オリゴヌクレオチドアライマーをドットスポットし

特表平5-504889 (32)

た要とのハイブリダイゼーション後に特定の臨床サンプル中に存在し得る種々の微生物の同時且つ特異的検出に特に有利であり得る。上記のような逆ハイブリダイゼーションアッセイで使用可能な特異的オリゴヌクレオチドプライマーの有利なパネルの例を以下に挙げる。

(i) 数パネル: <u>Horaxella(Branbanella) satarrhalia</u>

<u>Streptococcus pneumoniae</u>

Bannophilum influenzae

(ii) CSF-パネル: Meisseria meningitidis

Baenophilus influenzae

Streptococcus psevmonoise

(iii) 尿生殖ーパネル: Neisseria monorrhoese

Baemophilus ducrevi

Chlanydia trachonatia

Traponema pallidum

当然のことながら、これらのパネルは他の臨床的に関連する敵生物のアローブを加えることにより拡張することができる。歯周ポケットからのサンプル又は血液サンプルのような他の臨床サンプルのパネルも利用できる。

PCRには、非普遍的に保存されたプライマー、例えば

スペーサー銀版配列から、高度に関連する Bordete

| 1 a 種の同時検出に有用であり得るプローブを設計する
ことができる。Bordetella pertus 5 |

g以外のBordetella 種を検出するプローブも図

2 の配列から推定することができる。関機に、Morax
ella nooliquefsciens及びHaem
ophilus influenzae/バイオグループa
egyptiusの滞在的に特異的なプローブも失々図7

及び8に示すスペーサー配列から検定することができる。

スペーサー領域自体に配置されたアライマーも使用することができ、PCRは1組のプライマー用いて又は両一反応容器で覆々の組のアライマーを用いて実施することができ

増収段階なしに並ハイブリデイゼーションを実施することもできる。この場合、サンブル中に存在する核酸をハイブリデイゼーション前に例えば化学的年及又は特異的条料の認加により特異的又は非特異的に保養又は修飾すべきである。

ほとんどの場合、スペーサー模域から誘導され得る該当 生物の特異的アローブの数は、本明報書に記載するアロー ブに制限されない。

生物によっては、種々の細胞の高特異性且つ賞感度のプロープの開発のためにスペーサー保城を利用できることが立証されているプロープは1又は2種しか配数されていない。Bordetella pertussisのみが例外であり、スペーサー保城の唯一の特定領域(Bordetella pertussisのしながら、Bordetella pertussisの

本免明は更に、生物学的サンプル中で1種以上のNeisseria gonorrhoese株をin vitro被出するためのキットに係り、該キットは、

ー 個体支持体に固定された Neisseria <u>Rono</u> <u>rrhoeae</u>に特異的な本売明のプローブのいずれかか ら選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの観的配列を含むDNA及び/又はRNAの 酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、

一脚素的堆幅が可能であり及び/又は前記アローブと<u>Nelsaerla gonorrhoeae</u>株のDNA及び /又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じ させることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために 必要な成分と、

- 首記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを獲時検出するための手段とを含む。

本売明は更に、生物学的サンアル中で1種以上の<u>Nci</u> <u>Seria</u> <u>meninxitidis</u>株を<u>in</u> <u>vi</u> <u>tro</u>検出するためのキットに係り、競キットは、

- 固体支持体に固定された <u>Neisseria</u> <u>meni</u> <u>ngltidis</u>に特異的な本発明のプローブのいずれか

特表平5~504889 (33)

から選択された少なくとも1枚のアローブと、

- 該アローブの部的配列を含む DNA及び/又はRNAの 離集的推奨を連絡事業するために必要なアライマーと、
- 一静楽的増幅が可能であり及び/又は前記アローブとNe 1888年11 a meninsitidis 作のDNA及 び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生 とさせることが可能な緩慢液又は該緩慢液を生成するため に必要な成分と、
- ー 許配ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時後出するための手限とを含む。
- 本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の<u>Hae</u> <u>mophilus</u> <u>ducreyi</u>称を<u>in</u> <u>vitro</u> 救出するためのキットに係り、数キットは、
- 圏体支持体に固定された<u>Haemophilus du</u> <u>croyi</u>に特異的な本発明のアローブのいずれかから選 依された少なくとも1種のアローブと、
- 一該プローブの側的配列を含むDNA及び/又はRNAの 酵素的増集を遺跡実施するために必要なプライマーと、
- 酵素的増幅が可能であり及び/又は前記プローブと<u>Ha</u> <u>emophilus</u> <u>ducreyi</u>株のDNA及び/又

- はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な報告液又は該報告液を生成するために必要な統分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含む。
- 本発明は更に、生物学的サンアル中で1種以上の<u>Bra</u>
  <u>Dhameilla</u> <u>catarrhalis</u>株を<u>in</u> <u>v</u>
  <u>itro</u>検出するためのキットに係り、数キットは、
- 固体支持体に固定された<u>Branhamelia</u> <u>ca</u> <u>tarrhalis</u>に特質的な本発明のアローブのいずれ かから選択された少なくとも1種のアローブと、
- 一葉プローブの集的配列を含むDNA及び/又はRNAの 酵素的増幅を適時実施するために必要なアライマーと、
- 一脚業的増幅が可能であり及び/又は前記プローブと<u>Branella catarrhalls</u>枠のDNA 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を 生じさせることが可能な緩鬱液又は該緩衝液を生成するた めに必要な成分と
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。
- 本発明は更に、生物学的サンアル中で1個以上の<u>Bor</u> detella <u>pertussis</u>株を<u>in</u> <u>vitr</u> o核出するためのキットに係り、額キットは。
- 固体支持体に固定された Bordetella <u>Pertussis</u>に特異的な本元明のアローブのいずれかから 選択された少なくとも1種のアローブと、
- 該プローブの駆的配列を含むDNA及び/叉はRNAの 健素的増幅を遺吟実施するために必要なアライマーと、
- 一部案的増幅が可能であり及び/又は前記アローブと<u>Bordetella pertusels</u>株のDNA及び/ 又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は誤緩緩液を生成するために必要な成分と、
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを当時後出するための手段とを含む。
- 本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の<u>Hae</u> m<u>ophllus Influenzae</u>株を<u>ln v1</u> <u>tro</u>検出するためのキットにほり、棘キットは、
- 個体支持体に固定された<u>Haemophilus in</u> <u>fluenzae</u>に特異的な本発明のプローブのいずれか

から選択された少なくとも1種のアローブと、

- 該プローブの標的配列を含む DNA 及び/又はRNAの 酵素的増稿を演算家施するために必要なプライマーと、
- 一酵素的増幅が可能であり及び/又は前記アローブと<u>Haemophilus influenzae</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリグイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は該緩衝液を生成するために必要な成分と
- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運動権出するための手段とを会せ.
- 本見明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の<u>Streptococcus</u> <u>PReumoniae</u>株を<u>In</u> <u>vitro</u>検出するためのキットに係り、旗キットは、
- 固体支持体に固定された <u>Streptococcus</u> <u>pneumoniae</u>に特異的な本発明のアローブのいず れかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、
- 一 該プローブの振的配列を含む D N A 及び/又は R N A の 酵素的増售を適時実施するために必要なプライマーと、
- 酵素的増額が可能であり及び/又は前紀アローブと<u>St</u> reptococcus pneumoniae株のDN

A 及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応 を生じさせることが可能な緩慢液又は該緩慢液を生成する

ために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドも適時検出するための手段とを含む。

本売明は更に、生物学的サンアル中で1種以上の<u>Streptococcus</u> <u>agalactiae</u>様を<u>in</u> <u>vitro</u>検出するためのキットに係り、数キットは、

- 固体支持体に固定された Streptococcus <u>agalactiae</u>に特異的な本発明のプローブのいず れかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一該プローブの概的配列を含むDNA及び/又はRNAの 辞業的機構を道時実施するために必要なプライマーと、

一脚業的増傷が可能であり及び/又は前紀アローブと<u>Streptococcus agalactiae</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリグイゼーション反応を生じさせることが可能な組骸液又は放緩衝液を生成するために必要な成分と、

ー献記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。

のラベルを使用することができる。プローブは、\*\*P、\*\* S、\*\*\*1、\*H及び\*\*Cのような放射性トレーサーにより 細菌され得る。

放射性標識は、(展験すべき末端に応じて)放射性標識 ヌクレオチド、(ホスファターゼによる説リン酸化を伴う か又は伴わない)ポリヌクレオチドキナーゼ、末端転移師 素又はリガーゼを使用することにより、3'又は5'位の 末端観測のような任意の従来方法に従って実施され得る。 本発明のアローブの1種は、数種の放射性ヌクレオチド又 は数種の放射性及び非放射性ヌクレオチドから構成される 銀の合成用マトリックスであり得る。

本売明のプローブは、1又は数額の放射性ヌクレオチドを使用する化学的合成により製造することもできる。別の放射性振動方法は本売明のプローブの化学的ヨウ素化であり、プローブに数値の1\*\*1 原子を結合させる。

本売明のプローブの1 種が非放射性RNA又はDNAと のハイブリグイゼーションに使用するように放射性観識される場合、ハイブリダイゼーションの検出方法は、使用される放射性トレーサーに依存する。一般に、放射性トレーサーにより売生される電離性放射維を検出することが可能 特表平5-504889 (34)

本発明は更に、生物学的サンプル中で1種以上の<u>Campylobacter</u> jejuni及び<u>Campylobacter</u> jejuni及び<u>Campylobacter</u> coli株をin <u>vitro</u>検出するためのキットに係り、豚キットは、

一箇体支持体に固定された
Campylobacter
Jejuni
に特異的な本発明のプローブのいずれかから
選択された少なくとも1種のプローブと及び
Campyl
obacter
coliに特異的な本発明のプローブと
いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
一該プローブの個的配列を含むDNA及び/又はRNAの
即素的増幅を適時実施するために必要なアライマーと、
一部案的増幅が可能であり及び/又は前記プローブと
Campyl
obacter
jejuni及び/又は下NAと
の同にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は鼓緩衝液を生成するために必要な成分と、
一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含む。

アローブの使用条件

本売明のプローブは振騰すると有利である。任意の従来

なオートラジオグラフィー、液体シンチレーション、 r 計 数又は他の任意の従来方法を使用することができる。

免疫特性(例えば抗原又はハアテン)、ある種の試原に 対する特異的観和性(例えばリガンド)、検出可能な酵素 反応を提供する特性(例えば酵素、糖酵素、酵素基質又は 酵素反応に関与する基質)、又は物理的特性(例えば任意 の波長の光の蛍光、売光又は吸収)を有する残器に本発明 のプローブを組み合わせることにより非放射性無臓を使用 することもできる。プローブと個的とにより形成されるハ イブリッドを特異的に検出する技体も使用できる。

本発明のプローブを化学的に合成する場合には非放射性 ラベルを使用することができ、アデノシン、グアノシン、 シチジン、チミジン及びウラシル残器は、プローブ又はプ ローブと相補的DNAもしくはRNAフラグメントとの間 に形成されたハイブリッドを検出することが可能な他の化 学的発集に結合し得る。

一方、1種以上のヌクレオチドを他の化学的残器に結合することにより修飾した場合、プローブのヌクレオチド配列は本発明のプローブの1種のヌクレオチド配列と同一で

特表平5~504889 (35)

本発明は更に、上記のように暴躁され且つ検出可能な本 発明のアローブを使用してハイブリダイゼーションにより RNA及び/又はDNAを検出するための方法にも係る。 この点では、従来のハイブリダイゼーション方法を使用す ることができる。

生存生物起源の細胞又はそれ自体生存生物である細胞を検出するためには、化学的又は物理的方法を使用して細胞の部分的又は全溶解によりこれらの細胞のRNA及び/又はDNAに必要に応じてアクセスできるようにし、検定な本発明の1又は数徴のアローブと接触させる。この後触は、液体媒体又は溶液中でニトロセルロース、セルロース又はナイロンフィルターのような適当と数条件(即ち配列が所定の分子長で完全に相同である場合のみにハイデット形成可能な条件)下で実施され得る。このような条件は、進度、反応物質過度、最重核散対合過度を低下させる物質の存在(例えばホルムアミド、ジメチルスルホキシド及び、ステモ、及び反応容量を外見上低下させるか及び/又はハイブリッド形成を促進する物質の存在(例えばデキストラン磁酸、ポリエチレングリコール又はフェノール)を含む。ボリエチレングリコール又はフェノール)を含む。

ハイブリダイズしなかった本見明のアローブを除去するには、適切なイオンカ値及び適切な温度の緩衝溶液で洗浄し、場合により、SIヌクレアーゼ又は一本額DNAもしくはRNAを消化するが、DNA-RNAハイブリッドもしくは二本額DNAを消化しない他の任意の除素で処理する。

液体媒体中で、観覧DNA又はRNAフラグメントに対合した本発明のプローブのハイブリッドは程々の方法、例 とばヒドロキシアパタイト上のクロマトグラフィーにより 液体媒体の残余から分離することもできる。

次に、ハイブリダイズしたアローブをアローブ上のラベルにより検出する。

染色体 D N A フラグメントを駆的にするためには、R N A を 1 又は数種の酵素で処理し、D N A フラグメントを変性 (即ち賀飯を分離)した後、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で本是明のアローブの 1 種をD N A フラグメントと接触させ、ハイブリダイゼーションの表下に達するために必要な時間後、ハイブリダイズしなかったフラグメントをハイブリダイズしたフラグメントから分離し、細数核出について上述したようにラベルを被出する。

一般に、異種 D N A の存在が該当用途でプローブの特異性を損なわないならば、クローニングを可能にする組接 D N A 中に本発明の程々のプローブを含むこともできる。

(以下余白)

図1~図10には、種々の健生物中で発見されたスペーサー 便城のアライメント (全部または一部を配列したもの)が例として示されている。対 (match) 及び空所 (map) は各々、":"及び"一"で表されている。総ての配列に関して、非ーコードストランドは、その5、3、配列で示されている。

5 末端は、18S rRMA遺伝子の近位であり、3 末端は、23 S rRMA遺伝子の近位である。

図 1 ~図 10に参照される各生体 (<u>E. coli</u>の 1 種を除く) の 185と 235 rANA遺伝子との間のスペーサー領域の各核酸 配列は、新規であることは指揮されねばらならない。

図 1 には、<u>Neisseria</u> <u>gonorchoese</u>株 NCTC 8375(上列)及び [TN 4367(下列)の165と22S rRNA遺伝子との間のスペーサー銀線の16S rRNA近位塔の核数配列アライメントが示されている。

図2には、<u>Bordete]|a pertussis</u> ATCC 10380(上列)及び<u>Bordete||a bronchiscotica</u> MCTC 452(下列)の18Sと23SrRNAとの間のスペーサー仮娘の核酸配列アライメントが 示されている。

図3には、<u>Meisseria meningitidis</u> MCTC 10025(上共) 及び<u>Heisseria gonorrhoese</u> MCTC 8875(下列)の188と288 rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図4には、<u>Meisseria gonortboese</u> NCTC 8375(上列)及び<u>Bordetella gertussia</u> ATCC 10380(下列)の18Sと23S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図 5 には、<u>Branhapella estarrhalip</u> (TM 4197(上列)及び<u>Mainaeria gonorrhoeac</u> MCTC 8375(下列)の168と235 rRNAとの間のスペーサー仮娘の核酸配列アライメントが示されている。

図 6 には、<u>Nacaophilus duereri</u> CIP 542(上列)及び <u>Eacherichia coli</u>(下列)の165と235 rRMAとの間のスペーサー環域の核数配列アライメントが示されている。

図7には、<u>Branhamella estarrhalia</u> (TM 4197(上列)及び<u>Moraxella nonliquefaciena</u> ATCC 19975(下列)の18Sと 23S rRMAとの間のスペーサー電域の技能区列アライメント が示されている。

図8には、Haemophilus influenzae(パイオグループ
influenzae)NCTC 8143(上列)及びHaemophilus influenzae
(パイオグループ ecgyptise)17M 853(下列)の165と235

特異性及び感度に関する実験結果に関する。臨床に適当な以下の生体:<u>Meisseria gonorrhoeae</u>、<u>Meisseria meningi</u> tidis、Brashamella catarrhalis、Haemophilus ducreyi、 Haemophilus influenzae及びBordetella pertussisを選択 した。

実施例は、雅・特異性で多皮の高いプローブが、研究した能での生体のスペーサー 領域に容易に知見されたことを示している。さらに、雅・特異性で感度の高いプローブが16S及び/または23S rRNA分子に知見されない生体のこの領域からプローブが構築され得ることを示している。使用した方法は、他に記載しない限り、ROSSAUらのJ. Gen. Microbiol.; 135: 1735-1745、1989または欧州特許出額第8940/045.3に記載の方法と本質的に同一である。 rRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法及び逆ハイブリグイゼーションを除く総ての方法は現在当業者に公知である。 16S-23S rRNAスペーサー 領域を広げる rRNA遺伝子フラグメントの酵素的増幅法は、Perkin Elser Cetusの "Gene Asp"キットに推画される方法に従って実施したポリメラー ゼ値反応法(PCR)により持られた。 rRNA分子中に保存されたまたは半分保存された (seei-conserved) 領域に対応するヌクレオチ

特表平5-504889 (36) rRNAとの間のスペーサー保城の核酸配列アライメントが示されている

図9には、<u>Streptococcus anewsoniae</u> S90-5122(上列) 及び<u>Streptococcus arelactise</u> U90-2817(下列)の18Sと23 S rRNAとの間のスペーサー領域の核酸配列アライメントが示されている。

図10には、<u>Campylobacter</u> <u>jejuni</u> ATCC 33580(上列)及び<u>Campylobacter</u> <u>coli</u> ATCC 33559(下列)の18Sと23S rRMAとの間のスペーサー領域の23S rRMA近位率の核散配列アライメントが示されている。

使用した株は、各々培地コレクション: ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, HD, BSA.

CIP: Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France.

ITM: Institute of Tropical Medicise, Antwerp, Belgium.

NCTC: National Collection of Type Cultures, Cestral

Public Bealth Laboratory, London, United Kingson.

以下の実施例は、本発明のアローブの製造法及び程々の ハイブリダイゼーションアロトコルを使用するアローブの

ドをPCRアライマーとして使用した。逆ドット·ブロット法の原理及びアロトコルは、Seikiら(1989)により記載されている。

#### 実施例1

Meisseria meningitidis及びMeisseria monorrhocaeの両方は、各々健康炎及び滞底に関連する重要なヒト病原体である。これらの生体は非常に密接に関連しており、互い及び他のMeisseria Meconorrhocaeに特異的なDMAプローブは、両方のMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis及びMeisseria meningitidis meningitidis

<u>Neisseria gonorthoeae</u>を検出するために多くのDNAプロープについて記載されてきた(欧州特許出頭第0272 009号及び関第0337 896号; URDEA6, Clis.Chem.35:1571-1575, 1989; TOTTEN6, J.Infect.Dim.148: 462-471, 1989; DON ECAN6, Nol.Cell.Probes 3: 13-26, 1989; KOLBERG6, Mol.Cell.Probes 3: 59-72, 1989)。しかしながら、これらのプロープの内の要つかは、非-<u>Neisseria gonorthoeae</u>像と交差するか、速度が高くないことが知見された。これ

特表平5-504889 (37)

らのプローブは載て16S-23S rRNAスペーサー振娘由来ではなかった。

<u>Heisseria meningitidis</u>体を検出するDNAプローブも報告された(KOLBERGS, Hol.Cell. Probes 3:59-72, 1989)。
<u>Heisseria gonorrhoese</u>のピリン遠伝子から誘導されたこのプローブも、<u>Heisseria meningitidis</u>に関して非常に特異性でもなく感度も高くはなかった。

Neisseria gonorrhoese及びNeisseria geningitidia型 株の185と235 rRNA遺伝子との間のスペーサー機械の配列 を、スペーサー機械を広げるPCRフラグメント由来のクロ ーン化した物質を使用して決定した。図3に示されている 両方の列から、幾つかの潜在的なアローブ配列が明らかに なった。

約60塩基対の子想外の挿入配列を、<u>Neipseria seringit</u> idia特のスペーサー領域中に検出した。以下の配列:

GGTCAAGTGT GACGTCGCCC TG

NKJ 1

GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC

NKI 2

を有するオリゴヌクレオチドを、この挿入した配列から請 等した。

(図3のNeisseria meningitidig配列の塩基対365~386

w/v)、ポリビニルビロリドン(0.02%, w/v)及びシェアをかけて 実性したサケ 精液 DNA $(0.1ag/a\ell)$ であるか、または $5\times$ SSCの代わりに $3\times$ SSC $(1\times$ SSC:0.15M Na $C\ell$ .0.015M クエン酸ナトリウム。pB7.0)を使用し且つホルムアミドを20% (v/v)まで添加した以外には、非・放射性 DNAラベル及び検出キット $(Boehringer\ Manncheiu w)$ のプロトコルシートの溶液であった。洗浄液は、 $3\times$ SSC、20%ホルムアミド及び25%H リン酸塩緩衝液pB7.1を含んでいた。

ハイブリダイゼーションの結果は、以下の表にまとめられている。各アローブ等のハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、括弧内に示されている。試験した様でのプローブは、<u>Heigseria genorrhoese(プローブNCI1)またはMeigseria seningitidis(プローブNKI1, NKI2及びNMI3)</u>に対し非常に特異性で且つ感度が高かったことが証明された。

由来の)スペーサー策域のもう!つのエリアでも、Neisseria <u>eningitidia</u>と <u>Neisseria</u> <u>gonorrhogae</u>との間でかなりの 皮合いで食い違いが明らかになった。このエリアから、2 種類のオリゴタクレオチドプローブ(<u>Neisseria sepisgiti</u> <u>dis及び Neisperia gonorrhogae</u>の検出用のNNI3及びNCI1)

GEGITECTIA TAGETATETA CTGTGC NN13
CGATGEGTEG TTATTETACT TEGE NG11
が化学的に合成された。

これらのダクレオチドを、ボリヌクレオチドキナーゼを使用してその5' 末堰を\*\*Pラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してその3' 末畑でジゴキシゲニン化したUTPと結合して、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、親々の位置由来の多くの<u>Neisseria meningitidia</u>及び<u>Neisseria gosorrbogas</u>作由来のドット-スポットした変性ゲノムBNA及び他の種歯(bacterial taxa)由来の扱つかの株を使用した。

ハイブリダイゼーション・複合物は、3×SSC、25mH リン酸カリウム観響液、pH7、関イオン化ホルムアミド(20%、v/v)、Ficoll(0.02%、w/v)、ウシ血清アルブミン(0.02%、

	陽性株数/試験株数			
	IIMN	NMI2_	CIMM	NGII
<del>拉</del>	(45°C)	(45°C)	(40°C)	(SUC)
Neisseria meningitidis	52/53	10/11	36/36	0/11
Neisseria sp ATCC 43831	1/1	1/1	1/3	0/1
Neisseria gonorrhoese	0/16	0/9	0/10	10/10
Neisseria polysaccharea	0/3		0/3	0/3
Neisseria lactamica	0/10		0/10	0/10
Neisseria cinerea	0/4		0/4	2/4
Neisseria mucosa	0/3		0/3	0/3
Neisseria macacae	0/1		0/3	0/1
Neisseria flavescens	0/1	-	0/1	Q/1
Neisseria subflava	0/2	-	0/2	0/2
Neisseria sicca	0/1	-	Q/i	0/1
Neisseria elongata	0/2		0/2	0/2
Neisseria canis	0/1		0/1	0/1
Veisseria animalis	0/1	-	0/1	0/1
Neisseria denitrificans	0/1	-	0/3	0/1
Neisseria sp	0/5		0/4	0/3
CDC group M-S	0/1		0/1	0/1
CDC group EF-4a	0/1	-	0/1	0/1
Kingella denitrificaro	0/2	•	CVI	0/1
Kinecus kineac	0/1		0/1	Q/I
Simonsiella muelleri	0/1		0/3	0/1
Simonsiella crassa	0/1	-	0/1	0/1
Simonsiella steedae	0/3	-	0/1	0/1
Simonsiella sp	0/3	-	0/1	0/1
Alvsiella filiformis	0/1		0/1	0/1
Elkenella corrodens	0/2	-	0/2	0/2
Chromobacterium violsceum	0/1		0/3	0/1
odobacter fluviatile	0/1		O/)	0/1
Aquaspirilum disper	0/3	•	0/1	CV1
Comamonas testorceroni	0/3	-	0/1	O/1
Haemophilus influenzac	0/1			•
Haemophilus ducrevi	0/1	-	0/1	0/1
Kingella indologenes	0/3		0/1	0/1
Moraxella Iscunsta	0/1	-	-	•
Moraxella nonliquefaciens	0/1	•		-
Morazella catarrhalis	0/3	-	0/2	0/2
Moraxella suniculi	O/I	-	-	•
Morazella camae	0/1	-	•	•
Moraxella ovis	0/1	•	•	•
Moraxella osloensis	0/)	ž•	•	·
Escherichia coli	0/1	0/1	0/1	0/1

持表平5~504889 (38)

NNI 3 及びNCI 3 で検出する特異性を、165 rRNA遺伝子の
3' 末端及び235 rRNA遺伝子の5' 末端に各々配置している以 アの増集アライマー:

TGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

AP18

CAC GTC CTTCGTCGCCT

APZ3

とのスペーサー領域の酵素的増額後においてもチェックした。 <u>Neisseria gonorrhoese</u>、 <u>Neisseria gonorrhoese</u>、 <u>Neisseria geningitidis</u>。 <u>Naesophilus ducrezi</u>。 <u>Bordetella pertussis</u>及び
<u>Branhasella gatarrholis</u>の株由来のゲノムDNAの100ナノ
グラムをPCR反応に使用した。増幅後、収量の1/10をアガロースゲルに装填し、電気泳動させ、ナイロン膜上にプロットした。

使いてこの膜をアローブ NGI 1 及び NHI 3 でハイブリダイズした。

各々NGI1またはNHI3をプローブとして使用したとき、 Neisperia gonorrhoeseまたはNeisperia peniagitidis物 質が存在するレーンだけにはっきりしたハイブリダイゼー ションシグナルが検出できた。

#### 実施例 2

Bordetella pertussiaは、百日味の原因となる因子であ

Bordetella perturnisの検出用アローブは、文献(PARK 6,FENS Microbiol.Lett.52:19-24,1988; HcPHEAT及びHCN ALLY,J.Gen.Microbiol.133:323-330,1987及びFENS Microbiol.Lett.41:357-360,1987; McLAFFERTY6,Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology C-168,1986及びC-322,1987)に記載されている。
McLAFFERTY6(1986及び1987)に記載のアローブは、特異性が高くない。記載の他のアローブに関しては、示されたデータは特異性及び感度の度合いを推論するには不十分である。

以下の株のリボソームRNA遺伝子の一部を酵素的に増額・し、プラスミドベクター: Bordetella pertussia ATCC 10380、Bordetella parapertyssia NCTC 5952(亜株)及びBordetella bronchisaptica NCTC 452(亜株)にクローン化した。 種々の種類のクローン化したフラグメントを、ジデオキシ菓件止法を使用して一部配列し、その配列を比較した。 16S rRNA遺伝子に持わる配列情報は、種・特異性プローブが与えられないことを示している(ROSSAUら、未発表)。しかしながら図2のアライメントに示されたように、相同でないエリア(271塩基料~約300)がBordetella pertussia

る。再度の予防接種キャンペーンにより、この角気は先進国では殆ど同歴ではない、しかしながら第3世界の国々に 終いては、<u>Bordetella gertussia</u>は、幼児の変死率のトッ アである。

3 意葉の<u>Bordetella</u>様(<u>Bordetella pertussia</u>, <u>Bordete</u> <u>Ila parapertussia</u>, <u>Bordetella bronchiseptica</u>)の株は、 非常に関連しているので(<u>KL00S</u>ら, Int.J.Syst.Bacteriol. 31:173-176,1981; <u>DE LEY</u>ら, Ist.J.Syst.Bacteriol.38: 405-414,1988)、ひとつの遺伝子程に属するものとして寿 えるべきである。この意伝子型の関係は、これらの解析の 他の多くの特徴にも反映するので、その表現型の差別化が 冗長となる。

百日味の臨床兆候はたいてい非定型であり、検査室診断が必要である。 歩度が高く、特異的で迅速な試験はまだ無い。 特地には選択方法が残っているが、回収率は低く且つ結果は過常、接種徒3~7日しか有効でない (FRIEDMAN、Clip. Microbiol.Rev.4:365-376,1988; NALPERING, J. Clin.Microbiol.27:752-757,1988)。 BNAプローブペースの分析は、 Bordetelia pertuspiz 歩数の診断を非常に改良し得る。

及び<u>Bordetella bronchissptisa</u>件の16Sと23S rRNA遺伝子 との間のスペーサー機械に知見された。

<u>Bordetella parapertussis</u>株のスペーサー領域の配列は、 <u>Bordetella bronchiseptica</u>配列と大体同一である(ROSSAU ら、未発表)。

<u>Bordete} la pertussia</u>のスペーサー模様のヌクレオチド 271と295との間のエリアから、以下の配列:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT 8P!1 を有するオリゴヌクレオチドアローブを誘導した。

オリゴヌクレオチドプローブを化学合成し、ターミナルトランスフェラーゼを使用してジゴキシゲニン-UTPでラベルした。ターゲットとしてドット-スポットし、変性したゲノムDNAで得られた動果を以下の表にまとめた。

# <u>分類 55℃に於けるBP[]とのハイブリダイゼーション</u>

	所让你权/药板件权
Bordetella pertussis	4/4
Bordetella parapertussis	0/3
Bordetella bronchiseptica	0/3
Alcaligenes denitrilicans	0/1
Alcaligenes paradoxus	0/1
Oligella ureolytica	0/1
Oligella urethralia	0/1
Tarlorella equigenitalia	0/1
Pseudononas cepecie	0/1
Pseudononas solanacearum	0/1
Comamonas testosteroni	0/1
Neisseria meningitidis	0/1
Branbanella catarrhalis	0/1
Magaophilus influenzae	0/1

使用条件下に於いて、アローブBPII は<u>Bordetella pertu</u> <u>8318</u>に対し1008特異性で且つ1008の感度であることを証明 した。

ハイブリダイゼーション混合物は、5×SSCの代わりに3
×SSC(1×SSC:0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム。pH7.0)を使用し、ホルムアミドを205(\*/\*)まで添加したことを除いて、非-放射性DNAテベル及び検出キット(Boehringer Mannheing)のプロトコルシートに記載のものと同じであった。洗浄液は3×SSC、205ホルムアミド及び25mH リン酸塩緩黄液pH7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は55℃であった。

#### Sht.

#### 製施例3

Moraxella estarrhalisまたはNeisocria estarrhalisとも知られるBranhauella estarrhalisは、特殊培養器を必要とする生化学的に不活性な細菌である。近年、その重要な利尿体としての潜在能力が認識された。

Renhamella caterphalioは、食い気道感染症によく含まれる(BAGERら、Rev.lofcot.Die.9:1140-1149,1987)。 Branhamella catarphalisの診断には、特殊培養基を必要としない微生物による異常増殖により限止されるこの生体の培地と、この生体と口腔内に存在する共動生物(例えば、Reisserie種など)とを区別するための一組の表現塩試験器具とが必要である。

時々、表現型が類似の超歯由来のBranhamella catarrha Liaを表別化する試験は保られているので、表現型試験は、 徴定上のBranhamella catarrhalia単離物の識別に関して は決定的ではない(RIOU及びGUIBOURDENCBE, Drage 31[補 選、3]: 1-6, 1986)。分析に基づいたDNAプローブを使用す ると、Branhamella catarrhaliaの検査室診断をかなり簡 素化できる。未特定DNAフラグメントから誘導し、Neisser

## 

遊ドット・ブロット分析を利用すると、上記長に示されているのと本質的に関一結果が得られた。この分析は以下のように実施した:

異なる報道程から待られた意々の株からの最適DMAlas を、ジオキシゲニン-11-dUTP(Boebringer Honnbeim)を増 福港合物に抵加して最終準度40以前とした以外には Gene-Ampキット (Perkin Elver Cetus)の製造業者により推奨さ れるように酵素的に増振した。プライマーAP16及びAP23(実 旅例 1 参照)を用いて全部で50pgで30サイクル(1分/95℃。 1分/50℃、1分/72℃)実施し、その後各PCR混合物の5×ℓ を属の存在下にハイブリダイゼーション混合物(上記定義 進りの組成物)1 x & に添加し、これにプローブ 3P11 の 0.2 paol、0.02pucl及び0.002paolを固定した。ハイブリダイ ゼーションを55℃で1時間実施した。洗浄工程を同一温度 で10分間実施した。非·放射性DHAラベル及び検出キット (Boehringer Kannheia製)に記載の如く核出した。ゲル電 気泳動及び逆ドット-ブロットプロトコルを使用する臭化 エチジウム染色後に実験した全サンプル中にはっきりした バンドを検出したが、もっぱらBordetells pertussis DNAが存在するサンプルにはっきりした陽性シグナルが得

ia caviac由来のDNAで交差ハイブリダイズしたBranhauell a catarrhalio用のDNAプローブについては、BEAULIEU及び ROYにより記載されている(Abstracts of the Annual Meet ing of the American Society for Microbiology, Abetra ct No.D-249,1989)。

Branhaue) la catarrhalis 1TG 4187の rRNA遺伝子の一部を、ポリメラーゼ鎮反応法により酵素的に増幅させ、プラスミドベクターにクローン化した。鏡いて185-235 rRNAスペーサー領域を広げるフラグメントをジデオキシ鎮停止法により配列した。この配列は図7に示されている(上列)。配列データより、以下のオリゴヌクレオチド:

TATCAGAAGC AAGCTTCCTA ACTTCGTT BC! 1 を実択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5\*末郷でポリヌクレオチドキナーゼで<sup>32</sup>Pラベルし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。ターゲットとして、異なる位置の31

Branbangile catarrhelis 株及び他の細菌分類の19株のドット・スポットした、変性ゲノムDNAを使用した。

ハイブリダイゼーション·混合物は、3×SSC(L×SSC: 0.15M NaCe, 0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0)、25mM

待表平5-504889 (40)

Eikenella corrodens Xanthomonas maltophilia Xanthomonas gampestris NCTC 10596 LNC 958 LNC 588

であった.

#### 寒簾預4

軟性下疳の原因となる<u>Haceophilus ducreyi</u>は、特殊培養薬を必要とするグラム酸性細胞である。この生体の培施は関策で且つ感度が無いが、依然として、<u>Baceophilus</u> ducreyi感染の診断のための選択方法である。特異性の高いプローブを使用すると、境地が不要で且つ診断の感度が強くなる。他の<u>Baceophilus</u>及び<u>Pasignrelia</u>種と弱い交差反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子をダーゲットとする<u>Becnophilus</u> ducreyi用のクローン化したDNAプローブは、PARSONS分により記載されている(J.Clia.Microbiol. 27:1441-1445,1989)。

Hagsophilus ducres! CIP 542型株のrRHA遺伝子の一部をポリメラーゼ銀反応により酵素的に増築し、プラスミドベクターにクローン化した。

185と235 rRMA遺伝子との間のスペーサー信城の配列は、 ジデオキシ質停止法により得られた。核酸配列より、以下 のオリゴヌクレオチド:

リン酸カリウム緩衝液、pH7、酸イオン化ホルムアミド(20 1.v/v)、Ficoll(0.025.u/v)、ウシ血清アルブミン(0.025.u/v)、サシ血清アルブミン(0.025.u/v)、ボリビニルピロリドン(0.025.u/v)及びシェアをかけた実性したサケ精液DNA(0.1xg ud-1)であった。洗浄液は、3×SSC、205ホルムアミド及び25mH リン酸塩緩衝液pH 7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、30でであった。

使用条件下で、プローブ BCI 1 を能ての <u>Branhavella</u> <u>catarrhelio</u>株にハイブリダイズした。他の細菌程に属す る試験した株は能で、このプローブに対し強いハイブリダ イゼーションシグナルを与えた。

#### 試験した非-Branhamella catarrhalis株は:

Moraxella lacunata	ATCC 17967
Moraxella lacunata	ATCC 17852
Moraxella bovis	ITH 1601
Moraxella nonliquefaciens	ATCC 19975
<u>Neisseria guniculi</u>	ITM 3388
Meisseria ovis	NCTC 11227
Neisseria caviae	ATCC 14859
Alysiella so.	ATCC 29468
Moraxella ostoessis	LKG 1043
Moraxella osloensis	ATCC 17974
"Moraxella paraphenylpyruvica"	LMG 5125
"Moraxella camembertii"	LMG 7022
Psychrobacter immobilis	LNG 8784
Acinetobacter estocaceticus	ATCC 23005
Escherichia coli	В
Haenophilus influenzae	NCTC 8143

CACCCTITAA TCCGAAGATA TTACG HDI1 を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5'末環で\*\*Pラベルするか、 またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジゴキシ ン化 UTPとその3'末端を結合し、ハイブリダイゼーション

プローブとして使用した。

ターゲットとして、種々の位置からの41 Macrophilus ducreyi株及び他のパクテリア分類の幾つかの株の、ドット・スポットした変性したゲノムDNAを使用した。総てのMacrophilus ducreyi株にもっぱらハイブリデイズしたオリゴヌクレオチドプローブを試験した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、5×SSCの代わりに3
×SSC(1×SSC: 0.15H NaC2、0.015H クエン酸ナトリウム。
pH7.0)を使用し、ホルムアミドを20%(v/v)まで設加したことを除いて、3×SSC、25mK リン酸カリウム緩香液、pH7、
脱イオン化ホルムアミド(20%、v/v)、Ficoll(0.02%、m/v)、
ウシ血液アルブミン(0.02%、m/v)、ボリビニルピロリドン
(0.02%、m/v)及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA
(0.1mg m2-1)または、非-放射性DNAラベル及び検出キット
(Bookringer Kannheim製)のプロトコルシートの環液であっ

た。洗浄液は、3×SSC、208ホルムアミド及び25mM リン酸塩緩鬱液pN7.1を含んでいた。ハイブリダイゼーション及び洗浄温度は、40でであった。

試験した非-Haemophilus ducrevi株は:

Escherichia coli MC 1061
Escherichia coli MC 1061
Escherichia coli MC Actinobacillus actinosycetesoositans MCTC 9710
Actinobacillus lignieresii NCTC 4189
Haeaophilus sphrophilus MCTC 5906
Haeaophilus influenzae NCTC 8143
Bistophilus ovis HIM 896-7
Pasteurella syltocide NCTC 10822
Eranhamella catatrhalis ITM 4187
Comanomas testosteroni ATCC 17407
Oligella urethralis LNC 6227
Meisesria gonorhocae ITM 4437
Campylobacter jeiuni CCUG 11284
Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055
未贈別株 ITM 3565

であった。

## 英族例 5

グラム除性細胞器<u>Raceophilus</u> <u>influenzac</u>は、2種類のパイオグループ: <u>influenzac</u>及び<u>ecarptivs</u>に分類することができる(Casino, Ann.Inst.Pasteur/Microbiol. 1378:155-163, 1988)。 <u>influenzac</u>パイオグループの生体は、食要な呼吸器道の病原体であり、子供の脳繁炎及び耳炎の原因でもある。パイオグループ<u>ecarptius</u>単離物は、暑い

気候では、雌雄性結膜炎の原因として作用する因子であり、 ブラジル業業無と関連しているらしい(Brenserら、J.Clin. Microbiol, 28: 1524-1534, 1988)。分類可能な及び非一分 無可能なflacmophilus influenzaeは、核数プローブにより 迅速に検出され得る。

この種のDKAプローブは、文献に記載されている(Terpsi rab . Scand. J. Infect . Dis. 19:841-848, 1987; Malouinb . J.Clin.Microbiol.28: 2132-2138, 1988)。これらのプロ ープは185-235 rRNAスペーサー保娘から携帯されているも のではない。

**Baemophilus influenzae** NCTC 8143型株のrRNA遺伝子の 一部を、ポリメラーゼ鍼反応により酵素的に増幅させ、次 いでアラスミドベクターにクローン化した。

16Sと23S rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列が ジデオキシ銀停止方法により得られた。核酸配列から、以 下のオリゴヌクレオチド:

ACGUATURAM TIGACOGURO IT HILH ACTITICANCE GARACTIAN AC 8112 を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5°末端で<sup>31</sup>Pラベルし、ハイ

分類単位	アローブ	
	#111(50℃)	H115(30℃)
Haemophilus influenzae(Aftf#-7 influenzae)MCTC 8143	+	+
Haemophilus influenzae (#415%-7 influenzae) ITM 3837	+	+
Hapmophilus influenzae(Mffs-f argentius) ITM 859	-	+
Racmophilus parahaemolyticus ITM 402	-	-
Hacmophilus parainfluenzae ITM 1094	-	~
Bacmophilus aphrophilus MCTC 5906	-	-
<u>Haemophilus</u> <u>ducreyi</u> CIP 542	-	-
Pasteurella sultocida NCTC 10322	-	-
Pasteurella gicida ATCC 17911	-	-
Actinobacillus Lignieresii NCTC 4189	-	-
Actinobacilius actinomycetemcominitana NCTC 9710	-	-
Bistophilus gwig HIK 896-7	-	-
Pseudosonas cepacia ATCC 25609	-	-
Actinetobacter enleaceticus ATOC 23055	-	-
Brankamella catarrhalis LMC 5128	-	-
Bordetella pertussis NCTC 8189	-	-
Escherichia coli B	-	-
Neisseria meningitidia NCTC 10025	-	-

符表平5-504889 (41) ブリダイゼーションアローブとして使用した。ターゲット

として、郷藤の分類単位のドット・スポットした、変性し たゲノムDHAを使用した。

両方のアローブを使用したハイブリディゼーション結果 を以下の表にまとめた。使用したハイブリダイゼーション 及び洗浄温度では、アローブリ111はNaceophilus influen Zue バイオグループ gegyptius株にハイブリダイズしなかっ た。アローブ8112は、貫方のバイオグループの株にハイ プリゲイズした。荷方のプローブは、表示温度で、instit ute of Tropical Medicine, Antwerp, Belguinから得た他 の15種類のflacmophilus influenzae バイオグループinfiu enzaeの包床単蔵物にもハイブリダイズした。

ハイブリダイゼーション混合物は、3×SSC、25m8 リン 酸カリウム緩鬱液、p87、数イオン化ホルムアミド(20%。 v/v)、Ficol1(0.02%、w/v)、ウシ血液アルプミン(0.02%。 \*/v)、ポリピニルピロリドン(0.02%、\*/v)及びシェアをか けて変性したサケ精液DHA(O.lag xe-1)であった。洗浄液 は、3×SSC、20%ホルムアミド及び25mM リン酸塩糖療液のB 7.1を含んでいた。

Fig. 1

AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTUACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -5 	a
NGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAAAGA -5	
	0
TGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGAAACCGG -1	00
TGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGGAAACCGG -1	00
GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGTCGGA -1	50
GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGTCGGA -1	50
GGTTCAAGTCCTCCCAGACCCAACAAGAACGGGGGCATAGCT:AGTTGGT -2	00
GGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGGCATAGCTCAGTTGGT -2	00
AGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCCCTTTGCCT =2	50
NGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCGGTTTGCCT -2	50
	00
	••
CCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAGCTTAT -30	۸۸
CONTINUATION OF A STATE OF THE	"
PTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC	
1 1 6 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	
FTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATCGATC	

Fi	a.	3	

		AGAGAAGAAGAGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAAAG	-50
AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGTTGTTGTTAT		11111111111 (11111111111111111111111111	
######################################	-54	AGAGAAAGAAGGGGCTTTAGGCATTCACACTTATCGGTAAACTGAAA-G	-49
AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGTTGTTGTTAT			
Wayne Light Control of Charles Light Control Manager Land Control Manager	-30	ATGCGGAAGAAGCTTGAGTGAAGGCAAGATTCGCTTAAGAAGAGAATCCG	-100
ATAGCTGCTGGATCGGTGGCTGCTGATCCGAGAGAGAGAAAGGTTTCGCGGG	100	ATGCGGAAGAAGTTGAGTGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGGAAACCC	-••
**************************************	-100	VIOCOTVANTELISMO CONTRACTOR CONTR	-,,
		GGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGTCGG	-150
ATAGCTGCTGGATCGCTGGCTGCTGATCCGAGAGAAAGGTTTCGCGGG	-100		
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGGTCGTTG		GGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTCAGGTCGG .	-149
	-120		
		AGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGGGCATAGCTCAGTTG -	-200
TCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGGTCGTTG	-150	***************************************	
		AGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAGAACGGGGG-CATAGCTCAGTTG -	. 1794
GTTCGAATCCAACCAGACCCACCAAGGTTTCCTGAGAGGGGAAATGGGGGT	-200	GTAGAGEACETECTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCCGTTTGC -	-250
<u> </u>		111111111111111111111111111111111111111	
GTTCGAATCCAACCAGACCCACCAAGGTTTCCTGAGAGGGGAAATGGGGGT	-200	GTAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCCGTTTGC -	-248
GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTC	-250	CTCCACCAATACTUTACAAATCAAAACGGAAGAATGGAACAGAATCCATT -	-300
		######################################	
GTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCATCGGTTC	-250	CTCCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTT -	-280
C1000000010000010011100000000000000000		CAGGGGGACGTCACACTTGACCAAGAACAAAATGCTGATATAATAATCAG -	- 350
GATCCCGTTCACCTCCACCAAAGCCTGTCCAGAGGATGGGTGTGGHHNG-	-299	11111 1 1 111	
		TGCTGTTTTAGCAG -	-295
GATCCCGTTCACCTCCACCAGAGCCCGTCTTGAAGATGGGAGCGGGTTGG	- 300		
\C150\C \\C650\C\C\C\C\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\\		CTCGTTTGATTTGCACAGTAGATAGCAATATCGAACGCATCGATCTTTA -	-400
AGACCAG-AAGGCGAGAGAGCAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG	-342	t: 11711111111 111111 111111111111111111	
		CTTATTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGA-CGCATCGATCTTTA -	. 339
CAGGCGAGACCAGGAAAGGCGAGAGAACGTTAGTGCTGCGAGTCAGTG	-350	ACAAATTGGAAAGCGAAATCAACAAACAAAGACAAAGCGTTTGTTT	
TT1 1 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC			434
TTAAGCGTTGGGTTTTGGCCGACAGCTATATATGTTCTTTAACAATTTGG	- 392	ACAAATTEGAAACCCGAAATCAACAAACAAAGACAATGAGTTTGTTTTGA -	389
TTAAGCGTTGGGTTTTGGCCGACAGCTATATATGTTCTTTAACAATTTGG	-4 DD	TTTTTTATTCTTTGCAAAGGATAAAAAATCGCTCACAAGAGAAAAGAAAA -	500
		1 ( 1   1   1   1   1   1   1   1   1	
AAGAAGCACAACGTAAAGTGTTCGTTTAGTAGTCGGCGCGAGTCGATGAA	-442	TTTTTTATTCTTTGCAAAGGATAAAAAAATCTCTCGCAAGAGAAAAGAAAA -	-439
		CARACACAGTATTGGGTGATGATTGTATCGACTTAACCCTGAACACAA -	
AAGAAGCACAACGTAAAGTGTTCGTTTAGTAGTCGACGCGAGTCGATGAA	-450	111111 1111111111111111111111111111111	224
01000101000000000000000000000000000000		CAAACATAGTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAATCCTGAAACACAA -	419
CACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTCCAAGTCTCAAGAACTG	~492		
	***	AAGGCAGGATTAAGACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCAAACTAGGAAA -	-600
GACGGATACGGGTTGTGATTGCATGATTTTGTTCCAAGTCTCAAGAACTG	-500	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
		AAGGCAGGATTAAGACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCAAAGTAGGGAT -	.539
GETGGGGGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACTTATGAACGGCACA	-542	TTCAACTCTCATCTTCTAGTCAACGGAATGTTAGGCAAAGTCAAAGAAGT	
			-650
GCTGGGCGGCCAAGCGTTTGGTCAGATGCTTTGAACTTATGAACGGCACA	-550	TTCAAGTTTGCTTACTTAGTCAACGGGTAGGTAAACGAAGTCAAGAAGT -	589
AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG -582			
fillifititifiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiiii		TCTTGAAATGATAG -664	
AGCGCGAATGAACAGCACCTATAAGACTTTAGTGTTATAG -590		TCTTGAAATGATAG -603	
100000010000000000111NGIGITATAG +330		ILINAANIMIAN +VS	

Fig. 4

# A-GAGAAAGAAGGGGCTTT--AGGCATTEACACTTATCGGTAAACTGAAA -47 AAGAGCTTGAGTGCTCGTGTCAAGTGTCCACGCTTATCGGT---TGTTG -46 AGATGCGGAAGAAGCYTGAGTGAAGGCAAGGTTCGCTTAAGAAGGGAAAC -97 TINTATAGETECTGGATCGGTGGCTGCT-GATCCGAGAGAGAAAAGGTTTC -95 -CGGGTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGAGGT -146 GCGGGTCTGTAGCTCAGTCGGTTAGAGCACCGTCTTGATAAGGCGGGGGT -145 CGGAGGTTCAAGTCCTCCCAGACCCACCAAG-----AACG -181 CGTTGGTTCGAATCCAACCAGCCCACCAGGTTTCCTGAGAGGGAAATG -195 GOTTCGATCCCGTTTGCCTCCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTT -281 GOTTGGATCCCGTTCACCTCCACCAAAGCCTGTCCAGAGGATGGGTGTGG -295 GCTGTTTTTAGCAGCTTATTTTGATTTGCGAAGTAGAATAACGACGCATC -131 HNHGAGACCAGAAGGCGAGA-GA--GCAACGTT--AGTGCTGCGAGTC -338 GATCTTTAACAAATTGGAAAGCEGAAATCAACAAACAAAGACAATGAGTT -381 AGTGTTAAGCG-TTGG--GTTTTGGCCGACAGCTATATA--T-GTT -378 AAAAGAMAACAAACATA-GTATTTGGGTGATGATTGTATCGACTTAATCC -479 GCGCGAGTGGATGAAGACGGATACGGGTTGTGATTGCAT-GATTTTGTTC -476 TGRANCACARAAGGCAGGATTAAGACACAACAAAGCAGTAAGCTTTATCA -529 GTCAAAGAAGTTCTTGAAATGATAG -603 CTATAAGACTTTAGTG---TTATAG -582

Fla. 5

Fig. 5				
ACGANGTTATCTGATTGGCAAGAA24				
TCCACAACAG-TIGITCTITGGTAAGATGTTTAAAAC-GG -64 1: 11 :1: 1: 1: 1: 1: 1: 1: 1: 1: 1: 1:				
GTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTTGATAACGCGGGGGGTCAT -113 GTTTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACACGCTTGATAA-GCGTAAGGTCGG -149				
AAGTTCAAGTCTTATIAGACCCACCATTTT-GGGGGCCATAGCTCAGTTGG -162 1 111111111				
TAGAGESCETGCETTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCGACTCTCCTTCGC -212 TAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCATCGGTTCGATCCGTTTGCC -219				
TCCACCAAGCAAGTTAAACATCAAAGCATACATAAGCAATTAAATAAG -262 !!!!!!! !! !!! !!!!!!! !!!!!! !!! !!! TCCACCAAAACTTTACAAATGAAAGCAAGTTTGCTGTTTTTAGCAG -295				
ATTICTIATTIATGTTT-TATTITATAACTGA-CGAAGTTMIAACAT -310				
TATTANCAN-CATAGT-ATGAGTCTGGGTZMTTATTT -347 :				
ATTTCCAACAATAATTMACCTGGTGTTTGTACCCMIACAACA -392				
CCAAA				
GTA				
CALAGACTICCTAGALOTCAGACTACTIGG -490 [1				
GGTTGTAT -498				

Fig. 6

Fig. 7

C	
: CTTAACCTTCGGGAGGCCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGA -50	
ATAATAAAGAC	ACGAAGTTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTTGTTCTTTCGTAAG -50
AGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA -100	ACGAGATTATCTGATTGGCAAGAATCCACAACAAGTTGTTCTTAG-TAGT _49
AAGTACTCACACAGATTGTTTGATTGTTT -48	ATGTTTAAAAACGGGTCTATAGGTCAGTTGGTTAGAGCACCGTGTTGATA -100
CCTTAAAGAAGCGTACTTTGTAGTGCTCACACAGATTGTCTGATAGAAAG -150	GTAAGTTAAATTGGGTCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACCGCCTTGATA -99
AGAGAATCG	ACCCCCCCCCCATAACTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGCCA -150
TGAAAAGCAAGGCGTTTACGCGTTGGGAGTGAGGCTGAAGAGAATAAGGC -200	AGGCGGGGTCATAAGTTCAAGTCTTATTAGACCCACCATTTTGGGGTTA -149
CATCTTT	TAGETCAGTTGGTAGAGCGCCTTGCCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCG -200
CGTTCGCTTTCTATTAATGAAAGCTCACCCTACACGAAAATATCACGCAA -250	TAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCAGGAGTTCG -199
TGTCCCCATCTGTCTAGAGGCCTAGGACAT -106	ACTCTCCTTGGCTCCACCAAGCAAGTTTAAACATCAAAGCATACATAA -248
CGCGTGATAAGCAATTTTCGTGTCCCCTTC-GTCTAGAGGCCCAGGACAC -299	ACTOTECTTANCTCCACCACTTACAATAATGAGAACTAAGCAATCAAAT -249
CGCCCTTTCACGCGGGTAACCGGGGTTCGAAMCCCCGTGGACGCCATC -154	GCAATTAAATAAGATTTCTTATTTATGCTTTTATTTTA-TA -289
CGCCCTTTCACGGCGGTAACAGGGGTTCGAATCCCCTAGGGGACGCCA-C -148	TAGATAACATAAAATTAGATTTCTTACTTCTACTTTATGTAGATGACTTA -299
TAAAGATGATTTIT-ATTGTCTTATGTTCTTTAAAAAAATAGAACAA -201	AACTGACGAAGTTTATAACA-TTATTTAACAACATAG-TATGAGT -]]2
TTGCTGGTTTGTGAGTGAAAGTCGCCGACCTTAATATCTCAAAACTCA -196	CAATTAACTGATGAAGTTAATTTCAATTATTTAACAACGTATATATGAGT -349
GCTGAMACTGAGAGATTTTCTAAAGTAGAAGTCTGAGT-AATCT -246	CTGGGTTAATTATTTAATTCCAACAAATAATTAACCTGGGTTTGTAC-C -361
TCTTCGGGTGATGTTTGAGATHTTTGCTCTTTAAAAATCTGGATCAAGCT -446	CTGGGTTANTTATTTAATTCCAACAAATAATTAACCATTCCGTCATACTC -199
AAAATCTTAGCTGAACAAAAGCAGCTAAGTGTTTAGTCTAAATCATT -293	CAATACAACACCAAAA -198
GAAAATTGAAACACTGAACAACGAGAGTTGTTCGTG-AGTCTCTCAAATT -495	CACATCAAGCATATAAAGTTAAAACTTTTAGTATGATGATGATGATCGGATA -449
AACCACAAGTATATCAATATGCCTCGCGCATAATAAATACTTGAGGTTG =343	AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT -448
TTCG-CAACACGATGATGAATCGAAAGAAACATCTTCGGGTTG -537 TAT -346	AAGTAAAGAGAACTGAATCAAGCGTAAACATAGGTGAATCGTTACACATT -499
TAT - J46 TGA - S40	ACCCATACACCCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT -498
	ACCCATACACCCAAAGACTTCCTAGAAGTCAGACTACTTGGGGTTGTAT -549

Fig. 8

Fig. 9

#### 

#### Fig. 10

TAAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAATATAAAAATACAAACTC	
***************************************	
TAAAATCTAAAGCAAGTATATAAAGTAGATTAAATATAAAATACAAACTC	-50
TATACTTAGATTATTTTTATCTTTAACTATAAAAGAATATACTTTAATA	-100
***************************************	
TATACTTAGATTTATTTTTATCTTTAACTATAAAAGAATATACTTTAATA	-100
<b>AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTTATAATGAGATTATTT</b>	-150
<b>AATATAAATAACATATACATTATGTATTTATATTATAATGAGATTATTT</b>	-150
AATATATATGCTTCCTTTAGGTTTTAAACCTAAATGTTCTTTTTAATTAT	-200
***************************************	
aatatatatgcttcctttaggttttaaacctaaatgttctttttaattat	-200
CATTOTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTTAATAAAAACAATTTTACAGGACT	-250
***************************************	
CATTOTTAAGAGTCACAAGCAAGTTTTAATAAAAACAATTTTACAGGACT	-250
TGTTAAAGGATAAAACCTATTTATCTTTTCTTTGGTTTAACTTATATCTT	-300
**************************************	
TGTTAAAGGATAAAACCTATTTATCTTTTCTTTGGTTTAACTTATATCTT	-300
TTAATTATCTTTATTTCTATAATAAGAGAATATTAGATTTAAGATTTAT	-350
1 6 3 3 3 6 6 6 8 8 8 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9 9	
TTAATTATCTTTATTTCTATAATAAAGAGAATATTAGATTTAAGATTTAT	-350
NATTAAAGACAAGTTTCAAACTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT	-400
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
MATTAAAGACAAGTTTCAAACTCACAGCTTAGTTGAGACTAAATCATTT	-400
AGTTTTATATTAAGTGTTTGAATGCTTTCCGTCTTAAGATAAAGAAGTCT	-450
***************************************	
AGTITIATATTAAGTGTTTGAATGCTTTCCGTCTTAAGATAAAGAAGTCT	-450
PATCATAAAAACTITAACAAGGAAGTGATGCGTTTTAGAATCAATAATAA	-500
***********************************	
PATCATAAAAACTITAACAAGGAAGTGATGCGTTTTAGAATCAATAA	-500
AGGTAAAAA ~511	
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::	
MYGIAAAAA -311	

要的

本見明は、非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細菌のrRNA遺伝子間のスペーサー價域の少なくとも約15メクレオチド、許ましくは約15メクレオチド~スペーサー領域のほぼ最大散のメクレオチド、より許ましくは約15~約100メクレオチドから構成される非ウイルス数生物核出用プローブに係る。

# **補正書の写し(顕訳文)提出書(特許法第 184条の 4)**

平成4年10月19日週

## 特許庁長官 麻 生 波 数

- 1. 特許出版の表示 PCT/EP 91/00743
- 発明の名称
   16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域 から誘導される非ウイルス最生物検出用 ハイブリダイゼーションプローブ
- 3. 特許出願人
  - 住 所 ベルギー国、ベーー\$710・ヘント、ボツクス・ (、 インドウストリーパルク・ズベイナールデ・1
  - 名 弥 エヌ・ペー・イノヘネテイクス・エス・アー
- 4. 代 夏 人 東京都新宿区新宿 1丁目 1番14号 山田ビル (郵便番号 168) 電話 (82) 3354-8623 (6298) 弁理士 川 ロ 義 雄(元) (4208) (4208) (4208) (4208)
- 5. 補正書の提出年月日 1992年2月5日
- 6. 総附書額の目録
- (1) 補正律の翻訳文



1車

Branhame) la catarrhalia は、食い気道感染症によく含まれる (BAGERら、Rev.Infect.Dis.9:1140-1149.1987)。 Branhamells catarrhaliaの診断には、特殊培養器を必要としない数生物による異常増殖により限止されるこの生体の培地と、この生体と口腔内に存在する共動生物 (例えば、Nefaseria 種など)とを区別するための一組の表現症試験器具とが必要である。

時々、表現型が類似の細胞由来のBranhamella estarrhalisを差別化する試験が限られているので、表現型試験は、推定上のBranhamella estarrhalis単離物の識別に関しては決定的ではない(RIGU及びGUIBOURDENCHE, Drues 31[権 遠 .3]: 1-6, 1986)。分析に基づいたDMAアローブを使用すると、Branhamella estarrhalisの検査高齢断をかなり簡素化できる。未特定DMAフラグメントから誘導し、Meisser is caviae由来のDMAで交差ハイブリダイズしたBranhamella estarrhalis用のDMAアローブについては、BEAULIEU及びROYにより記載されている(Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Abstract No.D-249,1989)。

Branhameila catarrhalis iTG 4197の rRNA遺伝子の一部

を、ポリメラーゼ無反応法により酵素的に増殖させ、アラスミドベクターにクローン化した。続いて165-235 rRNAスペーサー 無域を広げるフラグメントをジデオキシ無停止法により配列した。この配列は図7に示されている(上列)。 配列データより、以下のオリゴヌクレオチド:

TTAAACATCT TACCAAAC BC! 1 を選択し、化学的に合成した。

このオリゴヌクレオチドをその5'末郷でポリヌクレオチドキナーゼで<sup>31</sup>Pラベルし、ハイブリダイゼーションアローブとして使用した。ターゲットとして、異なる位置の31 <u>Branhamella catarrhalis</u>株及び他の郷窗分類の19株のドット-スポットした、変性ゲノムDNAを使用した。

ハイブリダイゼーション-混合物は、3×SSC(1×SSC:

0.15N NaC2、0.015N クエン酸ナトリウム、pB7.0)、25mN
リン酸カリウム観香液、pB7、製イオン化ホルムアミド(20
S.v/v)、Ficall(0.025,m/v)、ウシ血清アルブミン(0.025,m/v)、ホリビニルピロリドン(0.025,m/v)及びシェアをかけて変性したサケ精液DNA(0.1mp m2-1)であった。

ターゲットとして、種々の位置からの41 <u>Raemophilus</u> ducreyi体及び他のバクテリア分類の幾つかの株の、ドット・スポットした変性したゲノムDMAを使用した。他ての <u>Raemophilus</u> ducreyi株にもっぱらハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドアローブを試験した。

ハイブリダイゼーション・混合物は、5×SSCの代わりに3
×SSC(1×SSC: 0.15M MaCe, 0.015M クエン酸ナトリウム、
pH7.0)を使用し、ホルムアミドを205(v/v)まで添加したことを除いて、3×SSC、25aM リン酸カリウム緩實液、pH7、
数イオン化ホルムアミド(205、v/v)、Ficoll(0.025、u/v)、ウシ血清アルブミン(0.025、u/v)、ボリビニルピロリドン(0.025、u/v)及びシェアをかけて文性したサケ糖液DNA(0.1ag af·)または、非・放射性DNAラベル及び被出キット(Boebringer Mannheim以)のプロトコルシートの溶液であった。

この生体の培地は、困難で且つ感度が無いが、依然として、
Haenophilus duoreyi感染の診断のための選択方法である。
特異性の高いプローブを使用すると、培地が不要で且つ診断の感度が強くなる。他のExemophilus及びPasteurelja機と弱い交差反応性を示し、蛋白質をコードする遺伝子をターゲットとする Haenophilus ducreyi用のクローン化した
DNAプローブは、PARSONSらにより記載されている(J.Clia、Mierobiol、27:1441-1445,1989)。

Recepohilus duoreyi CIP 542型株のrRNA遺伝子の一部をポリメラーゼ銀反応により酵素的に増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。

185と235 rRNA遺伝子との間のスペーサー領域の配列は、 ジデオキン領停止法により得られた。核数配列より、以下 のオリゴヌクレオチド:

TTATTATGCG CCAGGCATAT TG RDi1 を選択し、化学的に合成した。

オリゴヌクレオチドをその5' 末端で<sup>33</sup> P ラベルするか、またはターミナルトランスフェラーゼを使用してジゴキシン化 UTPでその3' 末端を結合し、ハイブリダイゼーションプローブとして使用した。

## 精正書の写し (翻訳文) 提出書 (特許法第 184条の 8)

平成4年10月19日

**3** 

## 特許庁長官 麻 生 减 殿

- 1. 特許出願の表示 PCT/EP 91/00743
- 発明の名称 16S及び23SrRNA遺伝子間のスペーサー領域 から誘導される非ウイルス製生物検出用 ハイブリダイゼーションプローブ
- 3. 特許出版人
  - 住所 ベルギー図、ベーー!!!!・ヘント、ボックス・ l、インドウストリーパルク・ズベイナールデ・! 名称 エヌ・ベー・イノへネテイクス・エス・アー
- 4. 代 理 人 東京都新宿区新宿 1丁目 1番1(号 山田ビル
- (新度番号 160) 電話 (91) 135(-862) (6100) 弁理士 川口 義 雄(74) か3名)
- 5. 補正等の提出年月日 1992年2月25日
- 6、 総附書類の目録
- (1) 補正書の翻訳文



1 2

#### 特表平5-5D4889 (46)

#### 請求の範囲

1. 原核生物、より特定的には細胞の165及び23SrRNA連伝子間の転写スペーサー根域の少なくとも約15 ヌクレオチド、好ましくは約15ヌクレオチド~スペーサー根域のほぼ最大数のヌクレオチド、より好ましくは約1 5~約100ヌクレオチドから構成されるアローブ。

2. 検出すべき非ウイルス生物、特に原核生物、より特定的には細菌に固有であるように選択された r R N A 遺伝子間のスペーサー領域、特に16S r R N A 遺伝子及び23S r R N A 遺伝子間のスペーサー領域の配列にハイブリディズするために十分相補的なオリゴヌクレオチドを積縮する段階を含む方法で得られるようなハイブリディゼーションアッセイ用プローブであって、 r R N A 遺伝子間のスペーサー領域の前記配列が、

- ◆ 目的生物の r R N A 遺伝子間のスペーサー領域の s ク レオチド配列を、最近限額の r R N A 遺伝子間のスペーサ ー領域の s クレオチド配列と比較し、

●最近隔積のうちの少なくとも1種のrRNA遺伝子間のスペーサー領域との間に少なくとも1つのミスマッチを有する目的生物のrRNA遺伝子間のスペーサー領域の少な

くとも約15ヌクレオチド、好ましくは約15~ほぼ最大 数のヌクレオチド、より好ましくは約15~約100ヌク レオチドの配列を選択することにより、又は

- \* 短離スペーサー戦域を得るように、目的生物の r R N A 遠伝子間のスペーサー戦域から t R N A 遠伝子及び場合によりシグナル配列を欠失させ、

\*少なくとも約15ヌクレオチド、許ましくは約15〜スペーサー領域のほぼ最大数のヌクレオチド、より許ましくは約15〜約100ヌクレオチドから精成され且つ目的生物の核酸(DNA及び/又はRNA)と特異的にハイブリダイズすることが可能な特異的ヌクレオチド配列を試行機 額により決定することにより、

選択されることを特徴とする請求項1に記載のプローブ。

3.-核酸グループ:

グループNGI1:

CGATGCGTCG TTATTCTACT TCGC	NCII
GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG	NG   1   C
GEGAAGUAGA AUAAEGAEGE AUCG	NGIIICR
CEVACCENCE NOVACCAVCA ACCC	NGIIR
グループNC12:	

TICGITIACC TACCCGTTGA	CTANCTANGE ANNE	NC 12	TECETTCEAT ATTECTATET ACTETECA	NH14
GTTTGCTTAC TTAGTCAACG	CGTAGCTAAA CGAA	NGIZIC	TGCACAGTAG ATAGCAATAT CGAACGCA	HH [4]C
GUUUCCUUAC UUACUCAACG	CEUACCUAAA CCAA	NG121CR	RECUCAGRAG ANAGCAANAR CGAACGCA	NMI41CR
UUGGUUDACC UACCCGUUGA	CDAAGUAAGE AAAC	NGIZR	ACCCRACEVA VANCENVACA VCBCACCV	NHI4R
グループNMI1:			グループNH15:	
GGTCAAGTGT GACGTCGCCC	TG	RHI1	TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGACGTCGCCCTGAATGGATTCT	GTTCCATT
CAGGGGGACG TCACACTTGA	cc	NHIIIC		NN 15
CAGGGCGACG UCACACUUCA	cc	NN111CR	AATCGAACAGAATCCATTCAGGGGGACGTCACACTTGACCAA	GAACAAAA
CCUCAAGUGU GACGUCGCCC	a c	RMI1R		NHISIC
グループNM12:			AABGGAACAGAABCCAUUCAGGGCGACGUCACACBUGACCAA	GAACAAAA
STTCTTGETC AAGTGTGACG	TC	NRIZ		NK [ 5 I CR
GACGTCACAC TTGACCAAGA	AC	NH121C	BUUBEUUCBUEGUCAAGUGUGACGUCGCCCUGAAUGGAUUCB	GUUCCAUU
GACGUCACAC BUGACCAAGA	AC	NKIZICR		NH E 5 R
CUUCUUCGUC AACUGUGACC	ис	NHIZR	グルーア NM18:	
グループNNI3:			TITECCTARC ATTCCGTTGA CTAGARCATC AGAC	NHIS
GCGTTCGTTA TAGCTATCTA	CTGTGC	NK13	GTCTGATGTT CTAGTCAACG GAATGTTAGG CAAA	NK361C
GCACAGTAGA TAGCTATAAC	GAACGC	NHIBIC	CUCUCAUGUU CUAGUCAACG GAAUGUUAGG CAAA	NKIBICR
GCACAGUAGA UAGCUADAAC	GAACGC	NNISICR	UUUGCCUAAC ADDCCGBUGA CUAGAACAUC AGAC	NH I GR
SCGUUCGODA UAGCVAUCUA	Cucucc	NHIBR	グループROI1:	
グループNK14:			TTATTATECE CEACECATAT TE	HD11

_		特惠亚5_	504889 (47)
CAATATGCCT CECGCATAAT AA	# D 1 1 f C	AAGTGGGTC AATTTGATGC GT	81(110
CAADAUGCCU CECGCABAAU AA	BBILICR	ANGUGEGEDE NYARACYARE ED	#1[1[CR
BDADUAUCCE CEAGECABAU UG	BDJIR	VCECVACVAV AREVECCEVYC AR	MIIIR
グループBCI1:		グループ N112:	`
TTARACATOT TACCARAG	BC 1 1	ACTTIGAAGT GAAAACTTAA AC	8112
CTTTGGTAAG ATGTTTAA	. 801110	CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT	B1121C
CANDRENATE VACABRY	BCI1ICR	CUUUAAGUUU UCACUUCAAA GU	BJIZICR
UUAAACAUCU DACCAAAG	9 C I 1 R	ACUUUGAAGU GAAAACUUAA AC	WJI2R
グループ BCI2:		グループSAI1:	
TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA	BCIZ	AATCGAAAGG TTCAAATTGT T	\$411
TCCACCAAGC AAGTTYAAAC ATCAA	BCIZIC	AACAATITGA ACCTTTCGAT T	\$41110
UCCACCAAGE AAGBUUAAAC AUCAA	BCIZICR	AACAADDUGA ACCUBUCGAU U	SAIIICR
ANGUARANA VVCABCCARC CACCV	BC12R	AAUCEAAAGC UUCAAAUUGU U	SAIIR
グループBPI1:		グループSAIZ:	
CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT	BP I 1	GGAAACCTGC CATTTGCGTC TT	SA 12
AAGCCTGTCC AGAGGATGGG TGTGG	8 P I 1 I C	AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC	SAIZIC
AAGCCUGUCC AGAGGAUGGG UGUGG	BPILICR	AAGACGCAAA UGGCAGGUUU CC	SAIZICR
CCACACCCAU CCDCUGGACA GGCUU	BPI1R	GCANACCUCC CARRACCERC DR	SAIZR
グループ HIII:		グループ SAI3:	
ACECATCAAA TTGACCGCAC TT	BIII	TECACGATET AGAAATAGAT TETAGAA	SAI3
TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA	SAIZIC	TTETGACETT TEAGTEATAA ACTE	\$ <b>F</b> 131C
DUCUACAAUC DAUBUCUAGA UCGUGGA	SAISICR	UDEBCACCUD UCAGUCAVAA ACUC	SPISICR
UCCAEGAUCU AGAAADAGAU UGUAGAA	SAIBR	SAGUEUAUGA CUGANAGGEC AGAA	SP13R
グループSA14:		から選択される核酸に属しており且つ 1	5~選択された核
TCTACTTTTA AAGAAACTAG GTT	SAI4	数の最大数のヌクレオテドを含む配列、	
AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA	SAI41C	下記の場合のいずれにおいてもプローブ	が対応する非修飾
AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA	SATATOR	配列と同一のRNA又はDNA額的とハ	イブリダイズする
UCUAGUUUA AAGAAACUAG GUU	5 A 1 4 R	という条件下で、	
グループSP11:		- ・夫々の末端のいずれかに1又は数値(	のヌクレオチドが
CTGAGAGATC ACCAACTAAT GCA	SPI1	付加もしくは除去されているか、	
TECATTACTT SETERTCTCT CAC	SPILIC	- 前記配列のいずれかで1個以上のメク)	レオチドが包換さ
DECAUDACUD GGUGAUCUCU CAC	SPIIICR	れているか、	
GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA	SPI1R	・その両方により前記配列のいずれかと』	なる安異配列を
グループSPIZ:		合むことを特徴とする競求項 1 又は 2 に 8	己載のプローブ。
AGGAACTGCG CATTGGTCTT	SP [ 2	4. 1種以上の <u>Neisseria</u> gc	norrhoe
AAGACCAATG CECAGTTCCT	SPIZIC	<u>&amp; e.</u> 枠を検出するためのプローブであって	:.
AAGACCAAUG CGCAGUUCCU	SPIZICR	- 核酸グループ:	
VCCVVCACC CVARCACAR	SPJ2R	グループNCI1:	
グループSP13:		CEATECETCE STATTCTACT TEEC	NG [ 1
GAGTTTATGA CTGAAAGGTC AGAA	SP13	CCCAAGTAGA ATAACCACGC ATCG	MGIIIC

72	亷	<b>1</b>	•	-5	n		01	n.	,	4	٥,	L
47	Æ	Ŧ	ה	-5	114	ľΧ	ж.	4	ι	41	ж.	9

CCCAAGUAGA AUAACCACGC AUCC NGJJJCR	よりアローブの部的配列を央叉する(fianking)
CEAUGEGUEG UDAUBEUACU UCGE MGIIR	2 種のプライマー、より好ましくは巣化的に高保存性の 2
グループ NGI2:	程のプライマーを介するポリメラーゼ銀反応を使用して増
TICGTITACC TACCCGTTGA CTAAGTAAGC AAAC NGI2	傷させた検出すべき株の核酸(DNA又はRNA)を必要
STTTGCTTAC TTAGTCAACG GGTAGGTAAA CGAA NG121C	に応じて選切な変性条件下でハイブリデイゼーションでき
CUUUGCUUAC UUAGUCAACG GGUAGGUAAA CGAA NG121CR	るようにしておいた前配生物学的サンプルを、プローブと
UUGGUUDACC UACCCGUUGA CUAAGUAAGC AAAC NGIZR	サンプル中に存在し得る <u>Neisseria gonor</u>
から選択される核酸に異しており且つ15~選択された核	r hoeae 年の相補的核酸との間のハイブリダイゼーショ
敵の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は	ンを可能にする条件下で請求項4に記載のアローブと要無
下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非修飾	させる段階と、特にサンプル中に存在し待る N c i s s c
配列と同一のRNA又はDNA根的とハイブリダイズする	<u>ria</u> <u>gonorrhoeae</u> 株のDNA及びRNAの
という角件下で、	両方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッド
- ・夫々の末端のいずれかに1叉は数個のメクレオチドが	が形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特

- · 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、
- ・前配配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置換されているか。
- · その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特徴とするプローブ。
- 5. 生物学的サンプル中でNeisseria gono rrhoeae様を検出するための方法であって、場合に

6 · ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC (1×SSC=0 · 15 M NaCi · 0 · 015 Mクエン酸ナトリウム。pH7 · 0)、約25 m Mのリン酸緩衝液 pH7 · 1、20%脱イオン化ホルムアミド、0 · 02% Ficoil、0 · 02% ケシ血清アルブミン、0 · 02% ポリビニルピロリドン及び約0 · 1 m g/m!の背断変性サ

ケ特子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン散観観液 PH7・1及び20% 配イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが請求項4に記載のプローブのいずれかであり、ハイブリデイゼーション温度が約50℃の範囲及び/又は洗浄温度が約50℃の範囲に適宜調節され、特に、前記額的配列と対応する該当ハイブリデイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

GCGAAGTAGA ATAACGACGC ATCG

HT及び/又はWT:50℃、

CUUUGCUUAC BUAGUCAACG GGUAGGUAAA CCAA

HT及び/又はWT:50℃であることを特徴とする静求 項5に記載の生物学的サンアル中でNeisseria <u>sonorrhoeae</u>を放出するための方法。

- 7. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全<u>Neisseria</u> <u>Eria gonorrhocae</u>様を<u>in</u> <u>vitro</u> 検出するためのキットであって、
- 請求項 4 に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
- ~これらのアローブと多数、好ましくは全 <u>N e i s s e r</u>

ia gonorrhocae株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩奪液又は該緩奪液を生成するために必要な成分と、

- 一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを避時検出するための手段とを含むか、又は
- 同一枚数分子を繋的にし、少なくとも1 種が<u>Nelss</u>eris <u>sonorrhoese</u>に対して特異的であり 且つ間求項4に記載のプローブのいずれか1 種から選択された少なくとも2種のプローブと、
- ーこれらのプローブと<u>Neisseria</u> <u>Ronorr</u> <u>hoese</u>体のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリ ダイゼーション反応を生じさせることが可能な頻質液又は 駄板衝液を生成するために必要な成分と、
- 前紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを避時検出するための手段とを含むか、又は
- 固体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのいずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、
- 一 飲プローブの係的配列を含む DNA及び/又はRNAの 酵素的増収を避時実施するために必要なプライマーと、

			<b>狩表平5-504889</b>	(49)				
一醇素的増售が可能であり及び/又はこれらの	プローブと	GUUCUUGGUC AAGUGUGACG		NH 1 2 R				
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	_傑のDNA	グループNMI3:						
及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーシ	・ョン反応を	CCCTTCGTTA TAGCTATCTA	CTCTCC	NK13				
生じさせることが可能な緩鬱液又は該種養液を	生成するた	GCACACTACA TACCTATAAC	GAACGC	NNISIC				
めに必要な成分と、		GCACAGBAGA VAGCUAVAAC	CAACGC	NWISICA				
一款紀ハイブリダイゼーションにより形成され	.たハイブリッ	GCGUUCGUUA WAGCUAUCUA	CUCUEC	NHI3R				
ドを連時検出するための手段とを含むことを特	微とするキッ	グループNHI4:						
۴.		TECETTECAT ATTECTATET	ACTGTGCA	NKI4				
8.1種以上の <u>Neisseria</u> meni	reiti	TGCACAGTAG ATACCAATAT	CGAACGCA	HH141C				
<u>d i ま</u> 株を検出するためのアローブであって、	•	DGCACAGUAG AUACCAAUAU	CGAACGCA	NN141CR				
- 核酸グループ:		UGCEUVCCAO AUUGCUAUCU	VCACACV	NNE4R				
グループ NKII:		グループNHI5:						
GGTCAAGTGT GACGTEGECC TG	NMI1	TTTTGTTCTTGGTCAAGTGTGA	CGTCGCCCTGAATGGATTCTG	TTCCATT				
CARGGCGACG TCACACTTGA CC	WHI11C			NNI5				
CAGGGGGACG BCACACBUGA CC	HRIITCR -	AATGGAACAGAATCCATTCAGG	GEGACGTEACAETTGACEAAG	AACAAAA				
GCDCAAGUGU GACGUCGCCC UC	HH t 1 R			NK151C				
グループNNI2:		AABGGAACAGAADCCABUCAGG	GCGACGUCACACUUGACCAAG	AACAAAA				
GTTCTTGGTC AAGTGTGACG TC	NHI2			NKISICR				

DISINN

NHIZICR

#### グルーアNHIB:

という条件下で、

GACGTCACAC TIGACCAAGA AC

GACGUCACAC UDGACCAAGA AC

	11	T	: C	C T	۸۸	С	A T	7 C	C	<b>C</b> 1	T		C	T۸	C A	Á	C A	T	0	A C	A C			ı	NK.	16		
	G T	C1	r C	۸Ţ	G T	T	C T	A G	T	CA	۸۱	C	G	A A	TC	T	TA	٥ ع		CAA	A A			ı	K PK	16	1 C	
	C U	c	) C .	A D	ច ប	U	C U	A G	U	C A	AC	20	G	۸ ۸	UC	¥ (	U A	CC	: (	: A I	N A			•	4 M ]	16	C	R
	U U	UG	C (	U.	A A	С	A U	0 C	C	C U	UC	A	CI	JA	C A	۸٥	CA	8 0	: 1	1 C /	۹۲			,	(8)	6 F	1	
	ψ,	6	z	択	ä	ħ	Ł	17	ŧ.	歐	Ŀ	展	L	τ	3.	<b>.</b>	ŋ	且	7	1	5	~	2	択	ŧ	ħ	た	枝
		Ø	表	<b>*</b>	数	0	, y	2	,	レ	オ	+	k	£	ż	; (	Ŀ	æ	列		又	壮						
	F	尼	Ø	46	ŧ	ø,	) b	4	۲,	h	ĸ	お	١,	τ	£		7	0		ナ	ď	Ħ	Æ	す	ŏ	非	修	#
1	2	列	Ł	网	_	n	R	. N			X	i±	D	N		. 8		**	٠,	,	1	7	13	×	,	¥	+	z

- ー・夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、
- ・前紀配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが置摘さ れているか、
- ・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特殊とするアローブ。
- 9. 生物学的サンプル中で<u>Neisseris</u> <u>meni</u> B.B. t. d.l.s.体を検出するための方法であって、場合 によりアローブの復的配列を夾叉する2種のアライマー、 より好ましくは進化的に高保存性の2種のアライマーを介

するポリメラーゼ銀反応を使用して増稿させた検出すべき 株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて達切な変性 条件下でハイブリグイゼーションできるようにしておいた 斡記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し 得るNeisseria meningitidis権の 相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする 条件下で請求項8に記載のプローブと接触させる段階と、 特にサンプル中に存在し得る<u>Neisseria</u> <u>men</u> ingitidis件のDNA及びRNAの両方とハイブ リグイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された 場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。 10:ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1 × S S C = 0 . 1 5 M N a C 1 , 0 . 0 1 5 M クエン酸 ナトリウム、pH7、0)、約25m鮭のリン鉄緩養液p H 7. 1、20%脱イオン化ホルムアミド、0.02%F i c o l l 、0 . 0 2 % ウシ血清アルブミン、0 . 0 2 % ポリピニルピロリドン及び約0.1mg/m1の剪断変性 サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、 約3×SSC、25mMリン酸緩衝後pH7、1及び20 % 脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア

DUBUGUUCUUGGBCAAGUGUGACGBCGCCCUGAAUGGAUUCUGUUCCAUU

NK 15R

ローブが請求項8に記載のプローブのいずれかであり、ハ イブリデイゼーション温度が約40~58℃の範囲及び/ 又は洗浄温度が約40~58℃の範囲に適宜調節され、特 に、前記載的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション 温度(HT)及び洗浄温度(WT)が央々、

CAGGGCGACG TEACACTTCA CC HT及び/又はWT:45℃、

GACGTCACAC TTGACCAAGA AC

HT及び/又はWT:45℃、

GCACAGTAGA TAGCTATAAC GAACGC

**HT及び/又はWT:40℃、** 

TECACACTAC ATACCAATAT CGAACGCA

HT及び/又はWT:48℃、

TTTTCTTCTTCGTCAACCTCTCACCTCGCCCTGAATGGATTCTGTTCCATT

HT及び/又はWT:58℃、

CTCTCATETY CTACTCAACC CAATGTTAGG CAAA

HT及び/又はWT:50℃であることを特徴とする請求 項5に記載の生物学的サンブル中で Nelsseria

1.1. 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全Neig

meningitidisを検出するための方法。

特表平5-504889 (50)

seria meningitidis##in vit <u>ro</u>検出するためのキットであって、

- 請求項8に記載のプローブのいずれかから選択された少 なくとも1種のアローブと

- これらのプローブと多数、好ましくは全<u>Neisser</u> ia meningitidis株のDNA及び/又はR NAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせるこ とが可能な観音液又は該観筒液を生成するために必要な成

一貫配ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを適時後出するための手段とを含むか、又は

一関一技能分子を裏的にし、少なくとも1種が<u>Neiss</u> eria meningitidiscolor转其的であ り且つ精求項8に記載のプローブのいずれか1覆から選択 された少なくとも2種のプローブと、

- Lth 6070- 72 Nelsserla mening itidis株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブ リグイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又 は鉄板筒放を生成するために必要な成分と、

一貫記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

## ドを遺跡検出するための手段とを含むか、又は

一箇体支持体に固定された請求項4に記載のプローブのい ずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

- 該プローブの限的配列を含むDNA及び/又はRNAの 群君的増福を遺跡実施するために必要なプライマーと、

一脚業的増幅が可能であり及び/又はこれらのアローブと Neisseria meningitidis株のDN A 及び/又はR N A との間にハイブリダイゼーション反応 を生じさせることが可能な被害放又は該親養液を生成する ために必要な成分と、

一枚記ハイブリゲイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを連時検出するための手段とを含むことを特徴とするキッ

12.1種以上の<u>Haemophilus ducrey</u> 1\_株を彼出するためのプローブであって、

- 核酸グループ:

グループ #011:

TTATTATECE CCAGGCATAT TC

ABILIC CAATATGCCT CGCGCATAAT AA BDILICE

CAABAUGCCU CGCGCADAAB AA

BRADUAUGCE CCACCEAUAU UC

BDIIR

から選択される核酸に属しており且つ15~選択された核 酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもアローブが対応する非体節 配列と間一のRNA又はDNA額的とハイブリダイズする というの件下で、

- ・夫々の末場のいずれかに1又は数備のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが度換さ れているか、

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 合むことを特徴とするプローブ。

13. 生物学的サンプル中で Haemophilus d u c r e y j 株を検出するための方法であって、場合に よりプローブの集的配列を夾叉する2種のプライマー、よ り好ましくは進化的に高保存性の2種のアライマーを介す るポリメラーゼ銀反応を使用して増幅させた検出すべき株 の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条 件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前 配生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存在し得

BDII

特表平5-504889 (61)

る Hacmophilus ducreyi</u>株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で酸求項12に記載のアローブと接触させる段階と、特にサンアル中に存在し得る Hacmophilus ducreyi株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。

14.ハイブリゲイゼーション媒体が、約3×SSC(11×SSC=0.15M NaCI,0.015Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝核pH7.1、20%設イオン化ホルムアミド、0.02%Ficoll、0.02%ケシ血液アルブミン、0.02%ボリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの対断変性サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝核pH7.1及び20%設イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが請求項12に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリゲイゼーション温度が約40℃の範囲及び/又は洗浄温度が約40℃の範囲に適宜調節され、特に、許記線的配列と対応する該当ハイブリゲイゼーション温度(HT)

及び洗浄温度(WT)が夫々、

CAATATGCCT CGCGCATAAT AA

ドT及び/又はWT:40℃であることを特徴とする請求 項13に記載の生物学的サンアル中で<u>Haemophil</u> <u>US ducreyi</u>を検出するための方法。

15. 生物学的サンアル中で多数、好ましくは全<u>Hacmophilus</u> ducreyittein <u>vitro</u>検出するためのキットであって、

一 請求項 1 2 に記載のアローブのいずれかから選択された 少なくとも 1 種のアローブと、

ーこれらのアローブと多数、好ましくは全<u>Haemoph</u>

1 1 up ducrey1 株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な経療液又は鼓緩衝液を生成するために必要な成分と、一貫紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は一関一核酸分子を駆的にし、少なくとも1種が<u>Haemo</u>ph1 1 us ducreyic対して特異的であり且つ

第求項12に記載のアローブのいずれか1種から選択され

ーこれらのプローブと<u>Haemophilus</u> <u>ducrey</u> <u>evi</u>作のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイ ゼーション反応を生じさせることが可能な軽衡液又は放緩 機能を生成するために必要な成分と、

- 育記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連絡体出するための手段とを含むか、又は

- 固体支持体に固定された棘求項12に記載のプローブの いずれかから選択された少なくとも1種のプローブと、

一 該プローブの集的配列を含むDNA及び/又はRNAの 酵素的増修を強時実施するために必要なプライマーと、

一部業的増額が可能であり及び/又はこれらのプローブと <u>Haemophilus ducreyi</u>株のDNA及び /又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じ させることが可能な報告被又は該級者被を生成するために 必要な成分と、

一前配ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手及とを含むことを特徴とするキット

16.1智以上の<u>Branhameila catarr</u> <u>halis</u>株を検出するためのプローブであって、 - 核酸グルーア:

た少なくとも2種のアローブと、

グルーアBCI1:

TTAMACATCT TACCAMAG 8C11
CTTTGGTAMG ATGTTTAM BC111C
CUUUGGUAMG AUGUUUMA BC111CR

BCIIR

グルーアBCI2:

DUAAACAUCU DACCAAAG

TTGATGTTTA AACTTGCTTG GTGGA BC12

TCCACCAAGC AAGTTTAAAC ATCAA BC121C

UCCACCAAGC AAGUUUAAAC AUCAA BC121CR

UUGAUGUUUA AACUUGCUUG GUGGA RC12R

から選択される核酸に属しており且つ15〜選択された核酸の最大数のメクレオチドを含む配列、又は 下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾

配列と同一のRNA又はDNA都的とハイブリダイズするという条件下で、

- · 夫々の末端のいずれかに1又は数据のメクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが収換されているか、

特表平5-504889 (52)

· その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特徴とするアローブ。

17. 生物学的サンアル中で<u>Branhamella</u> c <u>atarrhalls</u>株を検出するための方法であって、 場合によりアローブの銀的配列を交叉する2種のプライマ ー、より好ましくは単化的に高度存作の2階のプライマー を介するポリメラーゼ仮反応を使用して増幅させた検出す べき株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて進切な 変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしてお いた前記生物学的サンプルを、プローブとサンプル中に存 在L#8<u>Branhamella</u>cstarrhali <u>ま</u>株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能 にする条件下で請求項16に記載のアローブと接触させる 段階と、特にサンプル中に存在し得る<u>Branhamel</u> la catarrhalis 株のDNA及びRNAの両 方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが 形成された場合にこれを検出する股階とを含むことを特徴 とする方法。

18. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×5SC (1 ×SSC=0.15M NaCl.0.015Mクエン酸 ナトリウム、PHT、0)、約25mMのリン酸銀筒液PHT・1、20%酸イオン化ホルムアミド、0、02%F1coll、0、02%Pか直接アルブミン、0、02%F1coll、0、02%Fがリビニルピロリドン及び約0、1mg/mlの餌販変性サケ精干DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×SSC、25mMリン酸緩衝液PHT、1及び20%酸イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが翻求項16に記載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約30~42での範囲及び/又は洗浄温度が約30~42での範囲及び/又は洗浄温度が約30~42での範囲をれ、特に、前配額的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が夫々、

CTTTCCTAAC ATCTTTAA

H T 及び/又はW T : 3 0 ℃ TCCAECAAGC AAGTTTAAAC ATCAA

H T 及び/又はW T: 4 2 でであることを特徴とする前求 項 1 7 に記載の生物学的サンプル中で B r a n h a m e l l a catarrhalisを検出するための方法。 1 9 . 生物学的サンプル中で多数、好ましくは全 B r a n h a m e l l a catarrhalis 株 f n v j

<u>tro</u>検出するためのキットであって、

- 請求項16に記載のアローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のアローブと、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むか、又は

一関一核酸分子を観的にし、少なくとも1種が<u>Branhamella</u> <u>catarrhalla</u>に対して特異的であり且つ請求項16に記載のプローブのいずれか1種から 題択された少なくとも2種のプローブと、

ーこれらのアローブとBranhamells cata <u>rrhalis</u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハイ プリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液 又は該緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時後出するための手段とを含むか、又は

- 団体支持体に固定された請求項16に記載のプローブのいずれかから最択された少なくとも1種のプローブと、一該プローブの響的配列を含むDNA及び/又はRNAの酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと、一酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブとBranhamells たともまrrhalls株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な被養液又は該種香液を生成す

ー前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを盗時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット

20.1種以上の<u>Bordetella</u> <u>Pertus</u> <u>is</u>株を検出するためのアローブであって、

- 核酸グループ:

るために必要な成分と、

グループBPI1:

CCACACCCAT CCTCTGGACA GGCTT BPI1

AAGCCTGTCC ACAGGATGGG TGTGG BPI1IC

AAGCCUGUCC ACAGGAUGGG UCUGG BPI1ICR

CCACACCCCAU CCUCUGGACA GCCUU BPI1R

特表平5-504889 (53)

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非像的 配列と同一のRNA又はDNA額的とハイブリダイズする という条件下で

から選択される核酸に再しており且つ15~選択された核

酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

- ー・失々の末端のいずれかに 1 又は数据の3·クレオチドが 付加もしくは数去されているか。
- ・ 群紀配列のいずれかで 1. 個以上のヌクレオチドが置換されているか。
- · その両方により背配配列のいずれかと異なる変異配列を 合むことを特殊とするプローブ。
- 21. 生物学的サンアル中で Bordetells Pertussis 株 飲出するための方法であって、場合によりアローブの 概的 区列 を 交叉する 2 種の アライマー、より 好ましく は進化的に 高保存性の 2 種の アライマーを 介する ポリメラーゼ 銀反応を 使用して 増幅させた 検出すべき 株の 枝酸 (DNA 又は RNA) を必要に応じて 適切な 交性条件下で ハイブリダイゼーションできるようにしておいた 耐 配生物学的 サンアルを、アローブとサンアル中に存在 し得る Bordetella Pertussis 機の相補的

扶敵との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下 で請求項20に記載のアローブと接触させる段階と、特に サンプル中に存在し得る<u>Bordetella pert</u> <u>U s s i s</u>株のDNA及びRNAの両方とハイブリゲイズ するプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこ れを検出する段階とを含むことを特徴とする方法。 22. ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(I ×SSC=0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸 ナトリウム、pH7.0)、約25mMのリン酸緩衝液p H7、1、20%取イオン化ホルムアミド、0、02%F icoli、0、02%ウシ血精アルブミン、0、02% ポリビニルピロリドン及び約0、1mg/mlの剪断変性 サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、 約3×55C、25mMリン数報青額pH7.1及び20 %脱イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア ローブが請求項20に記載のアローブのいずれかであり、 ハイブリダイゼーション温度が約55℃の範囲及び/又は 洗浄温度が約55℃の範囲に適宜異節され、特に、前記様 的配列と対応する独当ハイブリダイゼーション温度(HT) 及び洗浄温度(WT)が夫々、

#### ANGCETGTEE AGAEGATEGE TETES

HT及び/又はWT:55℃であることを特徴とする請求 項21に記載の生物学的サンプル中でBordetell a <u>Pertussis</u>を検出するための方法。

- 23. 生物学的サンアル中で多数、好ましくは全<u>Bord</u> <u>etella pertussis</u>株を<u>in vitro</u> 検出するためのキットであって、
- 請求項20に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のプローブと、
- ーこれらのアローブと多数、好ましくは全<u>Bordete</u>

  <u>1 1 a Pertussis</u>株のDNA及び/又はRNA
  との間にハイブリゲイゼーション反応を生じさせることが
  可能な緩養液又は該緩養液を生成するために必要な成分と、
   前紀ハイブリゲイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むか、又は
- 一関一核酸分子を暴的にし、少なくとも1種が<u>Borde</u>
  <u>tella</u> <u>pertussis</u>に対して特異的であり且
  つ請求項20に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくとも2種のプローブと、
- ch sordetella pertu

<u>5.5.1</u> s株のDNA及びバ又はRNAとの間にハイブリケイゼーション反応を生じさせることが可能な観告液又は該観情液を生成するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は
- 固体支持体に固定された請求項 2 0 に記載のアローブの いずれかから選択された少なくとも 1 種のアローブと、
- 一該プローブの果的配列を含むDNA及び/又はRNAの 酵素的増額を遵明実施するために必要なプライマーと、
- 一類素的増級が可能であり及び/又はこれらのプロープと <u>Bordetella Pertussis</u>体のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生 とさせることが可能な緩響液又は数緩衝液を生成するため に必要な成分と、
- 一貫配ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを連時検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

特表平5-504889 (54)

24.1相以上のHaemophitus influe <u>fl z a e</u>株を検出するためのプローブであって、

- 核酸グループ:

グルーアB111:

ACGUATURAN TIGACUGURU TI H111

AAGTGCGGTC AATTTGATGC GT WILLIE

AACUGCGGUC AAUUUGAUGC GU BILLICE

ACGCAUCAAA UUGACCGCAC UU RIIIR

グループ E112:

ACTITGAAGT GAAAACTTAA AG RII2

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT ALI2IC

COUUAAGUDU BCACUUCAAA GD RIIZICR

#112R ACDUDGAAGU GAAAACUDAA AG

から避択される核酸に属しており且つ15~選択された核 数の最大数のメクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非体的 配列と同一のRNA又はDNA似的とハイブリディズする という条件下で、

- · 夫々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

×SSC = 0, 15M NaC1, 0, 015M2エン動

・前記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが製機さ れているか

・その両方により貧配配列のいずれかと異なる変異配列を 合むことを特徴とするプローブ。

25. 生物学的サンアル中で Haemophilus j nfluenzae株を検出するための方法であって、場 合によりアローブの裏的配列を夾叉する2種のアライマー、 より好ましくは進化的に高保存性の2種のアライマーを介 するポリメラーゼ無反応を使用して増傷させた検出すべき 株の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて違切な変性 条件下でハイブリグイゼーションできるようにしておいた 前紀生物学的サンアルを、アローブとサンアル中に存在し #&Hsemophilus influenzae#0 相補的核酸との間のハイブリデイゼーションを可能にする 条件下で請求項24に記載のアローブと接触させる段階と、 特にサンアル中に存在し得る<u>Haemophilus</u> j <u>n fiuentae</u>株のDNA及びRNAの両方とハイブ リダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された 場合にこれを被出する段階とを含むことを特価とする方法。 26、ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1

ナトリウム、PH7、0)、約25mMのリン酸緩衝液p H7、1、20%脱イオン化ホルムアミド、0、02%ド icoli.0.02%ウシ血清アルブミン、0.02% ポリピニルピロリドン及び約0、1mg/mlの剪断変性 サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、 約3×55C、25mMリン散観着液pH7.1及び20 %取イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるア ローブが請求項24に記載のアローブのいずれかであり、 ハイブリゲイゼーション温度が約35~55℃の範囲及び /又は洗浄温度が約35~55℃の範囲に濃度調節され、 特に、前記集的配列と対応する該当ハイブリダイゼーショ ン温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

AAGTGCGCTC AATTTGATGC GT

**HT及び/又はWT:55℃、** 

CTTTAAGTTT TCACTTCAAA GT

HT及び/又はWT:35℃であることを特徴とする請求 項25に記載の生物学的サンプル中で Haemophil <u>US influenzae</u>を検出するための方法。

27.生物学的サンアル中で多数、好ましくは全<u>日<sub>年 年 円</sub></u>

ophilus influenzae#fin vit <u>ro</u>検出するためのキットであって、

一請求項24に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1層のアローブと

ーこれらのプローブと多数、好ましくは全<u>日aemoph</u> ilus influenzae株のDNA及び/又はR NAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせるこ とが可能な報告液又は該線循液を生成するために必要な成

一前記ハイブリデイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを連時被出するための手段とを含むか、又は

一同一核酸分子を集的にし、少なくとも 1 種が <u>Haemo</u> philus influenzaeに対して特異的であ り且つ請求項24に記載のアローブのいずれか1種から選 択された少なくとも2種のアローブと

- これらのアローブと Haemophilus infl uenzae株のDNA及び/又はRNAとの面にハイブ リグイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又 は鉄板賃款を生成するために必要な成分と、

一首記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

特表平5-504889 (55)

ドを連時放出するための手段とを含むか。又は

一面体支持体に固定された競求項24に記載のアローブの

いずれかから選択された少なくとも1種のブローブと、

一該プローブの裏的配列を含む DNA及び/又はRNAの 酵車的増築を適時実施するために必要なアライマーと、

一脚無的増幅が可能であり及び/又はこれらのアローブと

Haemophilus influenzae#oDN

A及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な観客液又は鼓観客板を生成するために必要な成分と、

一貫記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを運輸検出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

28. 1種以上の<u>Streptococcus pneu</u> moniae様を検出するためのプローブであって、

- 核酸グループ:

グループSPI1:

GTEAGAGATC ACCAAGTAAT GCA

SPII

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

SPILLC

DECAUDACOU GEOGAUCUCO CAC

----

SPIIICR

GUGAGAGAUC ACCAAGUAAU GCA SP11R

グループSP12:

AGGAACTEES CATTESTETT SPIZ

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

SPIZIC SPIZICE

AAGACCAADG CGCAGUUCCU

SPIZE

グループSP13:

GAGTITATGA CTGAAAGGTC AGAA SPI3

TTCTGACCTT TCACTCATAA ACTC SPIBIC

DUCUGACCUU UCAGUCAUAA ACUC

SPIBICR

GAGBUUAUGA CUGAAAGGUC AGAA SPISR

から選択される検験に属しており且つ 1.5~選択された核 酸の最大数のヌクレオチドを含む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非修飾 配列と同一のRNA又はDNA額的とハイブリダイズする という条件下で、

ー・失々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか、

・教記配列のいずれかで1個以上のヌクレオチドが電換されているか、

· その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特徴とするプローブ。

29. 生物学的サンプル中で<u>Streptococcus</u>

PREUMONIAE
株を検出するための方法であって、場合によりアローブの標的配列を夾叉する2種のアライマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のアライマーを介するポリメラーゼ銀反応を使用して増幅させた検出すべき様の核酸(DNA又はRNA)を必要に応じて適切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サンブルを、アローブとサンアル中に存在し得るStreptococcus PREUMONIAE
を作下で前球項28に配載のアローブと接触させる段階と、特にサンアル中に存在し得るStreptoccoccus PREUMONIAE
の同方とハイブリダイズするアローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むことを特像とする方法。

3 0 . ハイブリデイゼーション媒体が、約3×SSC ( 1 ×SSC = 0 . 15M NaCl, 0 . 015Mクエン酸 サトリウム、pH7・0)、約25mMのリン酸銀質液pH7・1、20%酸イオン化ホルムアミド、0・02%Picoil、0・02%ウシ血清アルブミン、0・02%ボリビニルピロリドン及び約0・1mg/mlの許断変性サケ精干DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、約3×55C、25mMリン酸緩鬱液pH7・1及び20%酸イオン化ホルムアミドを含有しており、使用されるアローブが請求項24に配載のアローブのいずれかであり、ハイブリダイゼーション温度が約45℃の範囲に適宜質節され、特に、前配銀的配列と対応する該当ハイブリダイゼーション温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

TGCATTACTT GGTGATCTCT CAC

HTRU/XUWT: 45°C.

AAGACCAATG CGCAGTTCCT

HT及び/又はWT:45℃、

TYCTGACCTT TCAGTCATAA ACTC

H T 及 び / 又 は W T : 4 5 ℃ であることを特徴とする請求 項 2 9 に記載の生物学的サンアル中で <u>S t r e p t o c o</u> <u>c c u s p n e u m o n i a e</u>を 後出するための方法。

31. 生物学的サンアル中で多数、好ましくは会<u>St.re</u> ptococcus pneumoniae#tin v <u>itro</u>被出するためのキットであって、

- 請求塔28に記載のプローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のアローブと、

ーこれらのアローブと多数、好ましくは全<u>Strepto</u> coccus preumoniae#ODNABU/X はRNAとの間にハイブリグイゼーション反応を生じさせ ることが可能な練習液又は鼓展器液を生成するために必要 办成分と.

- 前紀ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを破跡検出するための手段とを含むか、又は

- 関一複数分子を裏的にし、少なくとも1種が<u>Strep</u> tococcus pneumoniaeに対して特異的 であり且つ請求項28に記載のアローブのいずれか1種か ら最択された少なくとも2種のプローブと、

- これらのアローブと<u>Streptococcus pn</u> <u>e u m o n i a e </u>株のDNA及び/又はRNAとの間にハ イブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝 液又は蘇緩循液を生成するために必要な成分と、

特表平5-504889 (56)

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを渡時検出するための手段とを含むか、又は

一箇体支持体に固定された請求項28に記載のアローブの いずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、

~禁プローブの無的配列を含むDNA及び/又はRNAの 群常的増級を連時実施するために必要なプライマーと、

一醇素的増幅が可能であり及び/又はこれらのアローフと Streptococcus pneumoniae#0 DNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション 反応を生じさせることが可能な被害液又は該被害液を生成 するために必要な成分と、

一節記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを重時放出するための手段とを会むことを兼豫とするキャ

32.1程以上のStreptococcus agal <u>B C t i B e</u>株を検出するためのアローブであって、

- 核酸グループ:

グループSAI1・

AATCGAAAGG TTCAAATTGT T

SAII

AACAATIIGA ACCITICGAT T

SALILC

AACAAUUUGA ACCUUUCGAU U SAILIER AAUCGAAAGC DUCAAABBCB B SATIR

グループSA12:

CCAAACCTCC CATTTCCCTC TT SALZ

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC SAIZIC

AAGACGCAAA UGGCAGGUDU CC SAIZICR

EGAAACCDCC CADBUCCCUC BU SAIZR

グループSAI3:

TECACGATET ACAAATAGAT TETAGAA SAIS

TICTACAATC TATTICTACA TEGTEGA SAIRIC

DUCBACAAUC UADDUCDACA BECDEGA SAIBIER

DCCACGAUCU ACAAAUAGAU UGUAGAA SAISR

グループSASA:

TCTAGTTTTA AAGAAACTAG GTT SA14

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA SAIGIC

AACCUAGUUU CUUUAAAACU AGA SA141CR

BCHACHUNA AAGAAACHAG GUD SATAR

から選択される核酸に無しており且つ15~選択された核 数の最大数のヌクレオチドを会む配列、又は

下記の場合のいずれにおいてもプローブが対応する非常能

配列と同一のRNA又はDNA集的とハイブリダイズする という条件下で、

- ・ 失々の末端のいずれかに1又は数個のヌクレオチドが 付加もしくは除去されているか.

・前記配列のいずれかで1額以上のヌクレオチドが置接さ れているか

・その両方により前記配列のいずれかと異なる変異配列を 含むことを特徴とするアローブ。

33. 生物学的サンプル中で Streptococcu E BERIACtiae株を検出するための方法であっ て、場合によりアローブの額的配列を夾叉する2種のアラ イマー、より好ましくは進化的に高保存性の2種のプライ マーを介するポリメラーゼ銀反応を使用して増幅させた検 出すべき株の枝喰(DNA又はRNA)を必要に応じて油 切な変性条件下でハイブリダイゼーションできるようにし ておいた前紀生物学的サンプルを、アローブとサンプル中 に存在し得る<u>Streptococcus</u> agaiac <u>もうa.e.</u>株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーション を可能にする条件下で請求項32に記載のプローブと接触 させる段階と、特にサンプル中に存在し得る<u>Strept</u>

<u>ococcus agalactiae</u>株のDNA及びR NAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブ リッドが形成された場合にこれを検出する段階とを含むこ とを特位とする方法。

34、ハイブリダイゼーション媒体が、約3×SSC(1 ナトリウム、pH7、0)、約25mMのリン酸緩衝液P サケ精子DNAを含有しており、及び/又は洗浄媒体が、 約3×SSC、25mMリン酸緩衝液PH7.1及び20 %説イオン化ポルムアミドを含有しており、使用されるア ローブが親求項32に記載のアローブのいずれかであり、 ハイブリダイゼーション温度が約35~45℃の範囲及び /又は洗浄法皮が約35~45℃の範囲に速度調節され. 特に、前記版的配列と対応する該当ハイブリダイゼーショ ン温度(HT)及び洗浄温度(WT)が失々、

AACAATITGA ACCTITCGAT T

**HT及び/スはWT:35℃**、

×SSC=0.15M NaCI,0.015Mクエン酸 H 7 . 1 、20%脱イオン化ホルムアミド、0 . 02%F icol1、0、02%ウシ血清アルプミン、0、02% ポリビニルピロリドン及び約0.1mg/mlの剪断変性

一同一核酸分子を傷的にし、少なくとも1種が<u>Strep</u> tococcus agalactiaeに対して特異的 であり且つ讃求項32に記載のアローブのいずれか1覆か **ら選択された少なくとも2種のアローブと、** 

- INSOTO-TEStreptococcus as <u>alactiae株のDNA及び/又はRNAとの間にハ</u> イブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な観情 撤又は鉄罐装液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを遺跡検出するための手段とを含むか、又は

一箇体支持体に固定された鎖求項32に記載のプローブの いずれかから重択された少なくとも1種のブローブと、

一駄プローブの祭的配列を含む D N A 及び/又はR N A の 群雲的増幅を道時実施するために必要なプライマーと、

一群素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと Streptococcus agaiactiae株の DNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション 皮応を生じさせることが可能な破情液又は該級情核を生成 するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ

AAGACGCAAA TGGCAGGTTT CC

**HT及び/又はWT:45℃、** 

TTCTACAATC TATTTCTAGA TCGTGGA

HT及び/又はWT:45℃、

AACCTAGTTT CTTTAAAACT AGA

**リア及びノスはWT・37であることを特徴とする雑求項** 3 3 に記載の生物学的サンプル中で<u>Streptococ</u> cus agalactiae を検出するための方法。 35、生物学的サンアル中で多数、好ましくは全 Stre ptococcus agalactiae##in v itro検出するためのキットであって、

- 請求項32に記載のプローブのいずれかから遊択された 少なくとも1種のブローブと、

- これらのアローブと多数、好ましくは会<u>らしても立し</u> <u>coccus agaiactiae</u>株のDNA及び/又 はRNAとの間にハイブリグイゼーション反応を生じさせ ることが可能な被害液又は該級病液を生成するために必要

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッ ドを適時検出するための手段とを含むか、又は

ドを適時検出するための手段とを含むことを特徴とするキッ

36. 1 世以上のCampylobacter lelu ni AU Campylobacter coli 株を映出 するためのプローブであって、プローブが重切な条件で<u>C</u>\_ ampylobacter jejuni&UCampy <u>lobacter coli</u>由来のDNA及び/又はRN Aのみとハイブリゲイズし、他の生物由来のDNA及び/ 又はRNAとはハイブリグイズしないという条件下で、囚 10に示す16S-23SrRNAスペーサー配列から誘 事される15~最大数のヌクレオチドの配列又はその相補 配列を含むことを特徴とするプローブ。

37. 生物学的サンアル中で<u>Campylobacter</u> jejuni Aucampyiobacter col 主体を検出するための方法であって、場合によりプローブ の祭的配列を夾叉する2種のアライマー、より好ましくは 単化的に高保存性の2覆のプライマーを介するポリメラー ゼ銀反応を使用して増催させた核出すべき株の核酸(DN A又はRNA)を必要に応じて渡切な変性条件下でハイブ リダイゼーションできるようにしておいた前記生物学的サ

ンプルを、プローブとサンブル中に存在し得る Campy loba cter jejuni及び Campy loba cter coli株の相補的核酸との間のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で散求項36 に記載のプローブと接触させる及階と、特にサンプル中に存在し得る Campy lobacter lejuni及び Campy lobacter coli株のDNA及びRNAの両方とハイブリダイズするプローブとの間でハイブリッドが形成された場合にこれを検出する及階とを含むことを特徴とする方法。

38. 生物学的サンアル中で多数、舒ましくは全<u>Campylobacter</u> <u>Jejuni及びCampylobacter</u> <u>coli</u>株を<u>in vitro</u>検出するためのキットであって、

ー請求項36に記載のアローブのいずれかから選択された 少なくとも1種のアローブと、

ーこれらのアローブと多数、好ましくは全<u>Campylo</u>bacter jejuni及び<u>Campylobacter</u> coli株のDNA及び/又はRNAとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な頻繁液

特表平5-504889 **(58)** 

又は該頓着液を生成するために必要な成分と、

も 2 屋のプローブと、

一貫記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時検出するための手段とを含むか、又は 一両一枝数分子を観的にし、少なくとも1階が<u>Campy</u> <u>lobacter</u> <u>jejuni</u>及び<u>Campyloba</u> <u>cter</u> <u>coli</u>に対して特異的であり且つ請求項36 に記載のプローブのいずれか1種から選択された少なくと

ーこれらのプロープと Campylobacter Je Juni及び Campylobacter coli 株の DNA及び/又はRNAとの面にハイブリディゼーション 皮店を全じさせることが可能な報告液又は該報告液を生成 するために必要な成分と、

- 前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを避時検出するための手段とを含むか、又は
- 固体支持体に固定された関求項36に記載のアローブのいずれかから選択された少なくとも1種のアローブと、
- 該プローブの駅的配列を含むDNA及び/又はRNAの
脚業的増額を選時実施するために必要なフライマーと、

 Campylobacter
 jejuni&びCampylobacter

 ylobacter
 coliter

 coliter
 coliter

 Aとの間にハイブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な緩衝液又は抜緩衝液を生成するために必要な成分と、

一前記ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを適時後出するための手段とを含むことを特徴とするキット。

39、被出すべき報生物に特異的な静泉項1から4、8、12、16、20、24、28、32及び36のいずれか一項に記載のプローブを使用して生物学的サンブル中に含まれる1種の数生物又は数種の数生物を同時に1n v1 1 1 ro 検出するための方法であって、好ましくはプローブ循報を突又する少なくとも1組のプライマーによる静素的増傷を使用して、生物学的サンブル中に存在する(家的配列を含む)DNA及び/又はRNAを稼業し、増傷した傷的配列と強上のアローブとの特異的ハイブリダイゼーションを可能にする媒体中で、1種以上のオリゴヌクレオチドプローブを房知の位置にドットスポットした順に前記生物学のサンブルを接触させ、ハイブリダイゼーションにより

形成されたハイブリッドを適切な手段により検出すること を特徴とする方法。

- 酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのアローブと

40. 生物学的サンアル中に含まれる1種の数生物又は数権の数生物を同時に<u>in vitro</u>検出するためのキットであって

ー検出すべき散生物に特異的であり、 腰にドットスポット した請求項1から4、8、12、16、20、24、28、 32及び36のいずれか一項に記載のプローブの少なくと も1種と、

- 技プローブの裏的配列を含む DNA及び/又はRNAの 酵素的増幅を適時実施するために必要なプライマーと - 酵素的増幅が可能であり及び/又はこれらのプローブと

検出すべき数生物のDNA及び/又はRNAとの間にハイ ブリダイゼーション反応を生じさせることが可能な報告液 又は鎮緩衝液を生成するために必要な成分と、

一醇配ハイブリダイゼーションにより形成されたハイブリッドを 遺時検出するための手段とを含むことを特定とするキット。

# 特表平5-504889 (69)

国际对主报告 PCT/EP 91/00743 OF BURNET PARTEE OF CORP 1 100 TO 100 Int.C1.5 Miles Comme -----C 12 Q Destination former other has Minteres Destinated in the Folia Security. CKCHICAL ABSTRACTS, vol. 112. March 1990, pages 224-225, abstract no. 93083s, (Columbus, Ohio, US); R.A. TORRES at al.: "Species and genus specificity of the interpentic spacer (IGS) in the ribotomal RMA genes of Cucurbitaceae", 6 Z. KATURFORSCH. C. 83085C. 1989, 44(31-12), 1029-34, see abstract CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112. Nay 1990. Dege 217, abstract no. 17351jb, (Columbus, Onio. US), G. MIDE et al.: "The identification of Tryparmyona brusef subspecies using repartitive DMA sequences" & MOL. 810CHEM. PARASITUL. 1990. 39(2), 213-25, see abstract 1 \* Species designates of disci disciplings; 0.

\*\* Observed referring the process tops of the same heads in our \*

\*\* Observed referring the process tops of the same heads in our \*

\*\* Observed referring to the process of the designation of the same heads of the process of the same heads of the same head of the same heads of the sam "F" jober demonstra political after the emercemental filters depi-or princips days and day to conflict with the expression day glad to a potential the production or telesty underlying the directions. party to margine and as dress in designed to party and the party of th there or Market or the Improvement Sensor Reserve 2.4 SEP 1991 19-08-1991 Mone N. KURPER EUROPEAN PATENT OFFICE

III. BEN'S SHE	NTS CONSIDERED TO BE BOLEVANT CONTINUES FROM THE SECOND SHEET	PC1/I	P 91/00743
Course !	Change of Communication, with technique, where appropriate, of the reference participation		
			Between in Clarks Ass.
^	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, September 1980, pages 391-392, abstract no. 89557. (Columbus, Ohio, US), v.E. EVANTS et al.: "The use of DAA probes for taxonomic study of Dictyostellum wild selates". & GENETICS 1988, 119(3), 561-9, seu abstract		1
^	BIDLOSICAL ABSTRACTS, vol. 83, no. 11, Movember 1807, abstract no. 104704, (Philadelphia, PA, US), M. YERM at al.; "Phylogenetic implication of heterogencity of the nontrenscribed spacer of ribosomal DMA repeating unit in various Maurospore and related fungal species", & CURR. GERT. 13(4): 205-284, 1807, see abstract		1
١	EP.A.0307270 (INSTITUT PASTEUR) IS March 1989, see abstrect; pages 3.4; claims 1-5	İ	1
.^	EP.A.0395292 (BIORESEARCH IRELAND) 31 October 1990, see abstract; page 6, lines 40-41		1
١	EP,A,0337896 (N.Y. IMMOGENETICS S.A.) 18 October 1989		
	EMBICAL ABSTRACTS, vol. 311, no. 9, 28 August 1989, Dees 204, abstract no. 22108s. (Columbus, Ohio, US), R. ROSAMU et al.: "Specific with sparia genorrhease DNA probes derived from erboseoses RNA", & J. GEW. RICKOBIOL. 1989, 135(6), 3738-45, see abstract.		3
		1	
- 1		- 1	1

# 19 跃 14 走 44 告

EP 9100743 SA 46810

This area; this lies pours (mail) mainters releating to the potent documents close in the observaments interestinate search report to extend the search of the contract of the

Present decembers climal de securcio empoya	Patricules date	7==	of Baratty Marija i	Pattern.
EP-A- 0307270	15-03-89	-A-9L	1257400	20-06-89
EP-A- 0395292	31-10-90	AU-A- JP-A-	5365290 \$130099	25-10-90 03-06-91
EP-A- 0337896	18-10-89	AU-A- JP-A-	3300489 2203800	19-10-89 13-08-90
			***************************************	******

持表平5~504889 (**60**)

第1頁の続き

@Int. Cl. \*

識別配号 庁内整理番号

//(C 12 N 15/11 C 12 R 1:44) (C 12 N 15/11 C 12 R 1:01)

**⑦発 明 者** パン・フーベルスウイン, ヒュ ベルギー国、ベーー9288・ラールネ、コルマンストラート・62 ーホ